

**Aus der Haut- und Poliklinik  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz**

**UNTERSUCHUNG ÜBER PROLIFERATION UND  
APOPTOSE IN DER MORPHOGENESE UND DER  
ANAGENPHASE DES MURINEN HAARFOLLIKELS**

**Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz  
dem Fachbereich Medizin vorgelegt  
von Markus Alexander Karl Magerl  
aus Heidenheim an der Brenz**

**Mainz, 2003**

**Dekan:**

**1. Gutachter:**

**2. Gutachter:**

**Tag der Promotion: 20.05.2003**

MEINEN ELTERN GEWIDMET

# Inhaltsverzeichnis:

1	Einleitung .....	1
1.1	Der Haarfollikel und der Haarzyklus.....	1
1.1.1	Die Haarfollikelmorphogenese.....	6
1.1.2	Katagen.....	9
1.1.3	Telogen-Anagen.....	9
1.2	Proliferation.....	14
1.3	Apoptose.....	17
1.4	Proliferation und Apoptose im Haarzyklus.....	24
2	Fragestellung .....	26
3	Materialien, Tiere und Methoden .....	27
3.1	Materialien und Geräte .....	27
3.2	Tiere.....	31
3.3	Methoden.....	33
3.3.1	Gewinnung und Verarbeitung der Hautproben .....	33
3.3.1.1	Haarzyklusinduktion.....	33
3.3.1.2	Gewebeentnahme.....	33
3.3.1.3	Gewebeverarbeitung für die immunhistochemische Verwendung .....	36
3.3.1.4	Gewebeverarbeitung für die hochauflösende Lichtmikroskopie und die Transmissionselektronenmikroskopie .....	36
3.3.1.5	Herstellung der Kryostatschnitte .....	37
3.3.1.6	Herstellung der Semi- und Ultradünnschnitte.....	37
3.3.2	TUNEL-Färbung und Immunhistologie .....	38
3.3.2.1	TUNEL in-situ Endmarkierung .....	38
3.3.2.2	Doppelfärbung TUNEL-ICE und TUNEL-Ki67 .....	40
3.3.2.3	Avidin-Biotin-Komplex-Methode .....	42
3.3.2.4	Einspannvorrichtung für Objektträger .....	44
3.3.3	Transmissionselektronenmikroskopie und hochauflösende Lichtmikroskopie.....	48
3.3.3.1	Semidünnschnitte und hochauflösende Lichtmikroskopie .....	48
3.3.3.2	Ultradünnschnitte und Transmissionselektronenmikroskopie .....	48
4	Ergebnisse .....	49
4.1	Apoptoseassoziierte Marker (TUNEL-Positivität und ICE Immunreaktion) in der Haarfollikelmorphogenese.....	49

4.2	Proliferationsassoziierter Marker Ki67 während der Haarfollikelmorphogenese .....	54
4.3	Beobachtungen mit der hochauflösenden Lichtmikroskopie in der Haarfollikelmorphogenese .....	59
4.4	Beobachtungen mit der Transmissionselektronenmikroskopie in der Haarfollikelmorphogenese .....	62
4.5	Proliferation und Migration tragen zur Zellaggregation der dermalen Papille bei .....	67
4.6	Apoptoseassoziierte Marker (TUNEL-Positivität und ICE Immunreaktion) in Telogen und Anagen des Haarzyklus .....	70
4.7	Proliferationsassoziierter Marker Ki67 während des Anagens .....	75
4.8	Beobachtungen mit der Transmissionselektronenmikroskopie im Anagen .....	76
4.9	Proliferationsassoziierter Marker Ki67 in Gewebe mesenchymaler Herkunft .....	81
4.10	Der Zelluntergang durch terminale Differenzierung .....	85
5	Diskussion .....	89
6	Zusammenfassung .....	100
7	Literatur .....	101
8	Danksagung .....	118
9	Lebenslauf .....	119

## Abkürzungen

ABC	Avidin- Biotin- Komplex
AK	Antikörper
AP	alkalische Phosphatase
ÄWS	Äußere Wurzelscheide
BrdU	Bromodeoxyuridin
BGS	Bindegewebscheide
CARD	caspase-recruiting domain
CARDIAK	CARD-containing interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme (ICE=Caspase-1) associated kinase
Caspase	cysteine aspartat-specific proteinase
CDK	cyclin dependant kinases
cIAP	cellular inhibitor of apoptosis
DD	death domain
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DP	dermale Papille
FADD	Fas- associated protein with death domain
Fas/Apo-1	CD95- Rezeptorprotein
FBS	fetal bovine serum (fetales Rinderserum)
HF	Haarfollikel
HRLM	high resolution light microscopy
ICE	interleukin-1 $\beta$ -converting-enzyme (Interleukin 1 $\beta$ -Konvertase)
ICE+	lies: ICE positiv oder ICE Positivität
IF	Immunfluoreszenz
IR	Immunreaktivität/ immunreaktiv
IWS	Innere Wurzelscheide
JNK	Jun N-terminal kinase
Ki67+	lies: Ki67 positiv oder Ki67 Positivität
KNS	Normalserum vom Kaninchen (nicht- immunisiert)
MNS	Normalserum von der Maus (nicht- immunisiert)
NF $\kappa$ B	nuclear factor $\kappa$ B
p.d.	post depilationem
p.p.	post partum
PARP	Poly(ADP-Ribose) Polymerase
PBS	phosphate- buffered saline (Phosphatpuffer)
RNS	Rinder Normalserum
RT	Raumtemperatur
TBS	Tris- buffered saline (Tris- Puffer)
TdT	terminale Desoxynukleotid- Transferase
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TNFR	Tumor Nekrose Faktor Rezeptor
TRADD	TNF receptor- associated death domaine protein
TRAF	TNFR-associated factor
TUNEL	TdT-mediated dUTP-digoxigenin nick end labeling (terminale Desoxynukleotid- Transferase vermittelte dUTP- Fluorescein gekoppelte DNA- Fragment- Markierung)
TUNEL+	lies: TUNEL positiv oder TUNEL Positivität
ZNS	Normalserum von Ziegen (nicht- immunisiert)

# 1 Einleitung

## 1.1 Der Haarfollikel und der Haarzyklus

Als Carl Linné (Linnaeus, 1758) die Säuger benannte, erhob er die Mammae als markantes und gemeinsames Merkmal zum Namensgeber und nannte sie Mammalia. Daran gemessen, hätte er sie genausogut Pilosa nennen können, da auch das Haarkleid ein den Säugetieren eigenes und gemeinsames Merkmal ist. Die Ausbildung von Haarschäften hat Säugetieren eine Reihe von evolutionären Selektionsvorteilen verschafft. Ihre Hauptfunktion besteht in der Wärmeregulation, in der Tarnung und der Hautprotektion vor mechanischen, chemischen und aktinischen Schäden. Die Melanozyten und Keratinozyten der bis ins subkutane Fettgewebe reichenden Haarfollikel sind ein wichtiges Zellreservoir für die Repigmentierung und Reepithelialisierung der Haut. Nach tiefen Verletzungen oder pathologischen Prozessen (Vitiligo) bilden oft die Haarfollikel den Ausgangspunkt der Wiederherstellung der Hautpigmentierung und des Epithels. Bei vielen Säugern haben Haare darüberhinaus soziale und sexuelle Signalwirkung. Sie unterstützen die Dispersion von Hautsekreten und sind Teil des sensorischen Apparates. Ein eher theoretischer Ansatz schreibt Haut und Haaren die Funktion von Ausscheidungsorganen zu, die über das in ihnen enthaltene stark kationenbindende Melanin den Körper von Schwermetallen befreien (Riley, 1997). Durch den weitgehenden Verlust seiner Körperhaare hat der Mensch auch die Hauptfunktionen des Haarkleides eingebüßt. Bis heute findet er dafür Ersatz in tierischem Haar in Form von Wolle. Die soziale und sexuelle Signalwirkung des dem Menschen verbliebenen Haarkleides gewinnt in unserer Gesellschaft hingegen zunehmend an Bedeutung und seine Erhaltung und Pflege ist zu einem potenten Wirtschaftsfaktor herangewachsen.

Der Haarfollikel wird als Anhangsgebilde der Haut gesehen und der größte Teil ist fest in ihr verankert, so daß Haut und Haar eine funktionelle und organische Einheit bilden. Doch ist es durchaus zulässig, den Haarfollikel als eigenes Organ mit eigenen Anhangsgebilden zu betrachten, das zu seinem Entstehen und Überleben auf die umgebende Haut angewiesen ist, aber selbst auch massiv auf die Morphologie seiner Umgebung einwirkt.

Von allen anderen Organen des Säugerorganismus unterscheidet sich der einmal entstandene Haarfollikel durch seinen lebenslang durchlaufenen Zyklus von

langen Phasen aktiven Wachstums (Anagen), sehr schnell ablaufender und koordinierter Regression (Katagen) sowie längeren Ruhephasen (Telogen) und dem nachfolgenden Wiedereintritt in die Anagenphase. (Trotter, 1924; Dry, 1926. Bei Säugetierspezies, bei denen diese zyklischen Wachstums- und Regressionsprozesse synchronisiert ablaufen, ändert sich auch die Morphologie der gesamten Haut im Verlauf des Haarzyklus dramatisch. Bei der Maus, z.B., gewinnt im Anagen die Epidermis vorübergehend mehrere zusätzliche Zellschichten, und auch Dermis und Subcutis nehmen an Dicke massiv zu (Chase, 1954; Hansen *et al*, 1984).

Über die biologische Uhr, die das Wachsen und die Involution dieses Organs steuert, wird spekuliert (Paus and Czarnetzki, 1992; Paus *et al*, 1999a) und verschiedene Erklärungsmodelle stehen zur Diskussion (vergleiche Kap. 1.1.3). Daß der Haarfollikel aber einer restriktiven Wachstumskontrolle unterliegt ist unstrittig und wird dadurch verdeutlicht, daß es trotz der physiologisch außerordentlich hohen Proliferationsrate nur äußerst selten zu Malignomen follikulären Ursprungs kommt.

Abbildung 1-1 zeigt Details des adulten Haarfollikels in der Höhe des zentralen

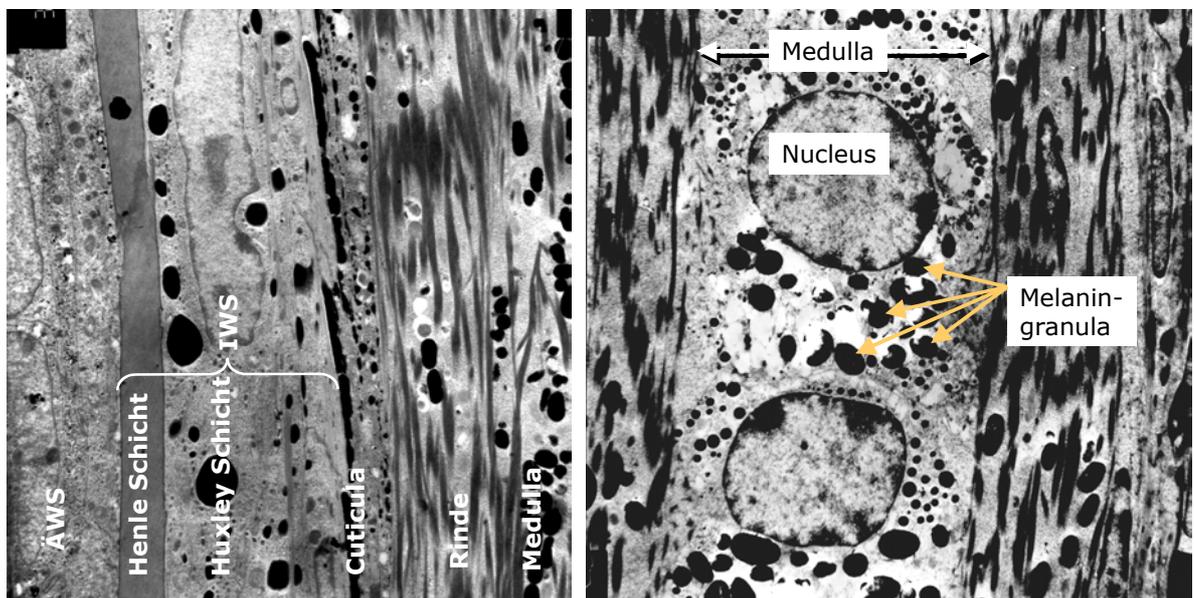
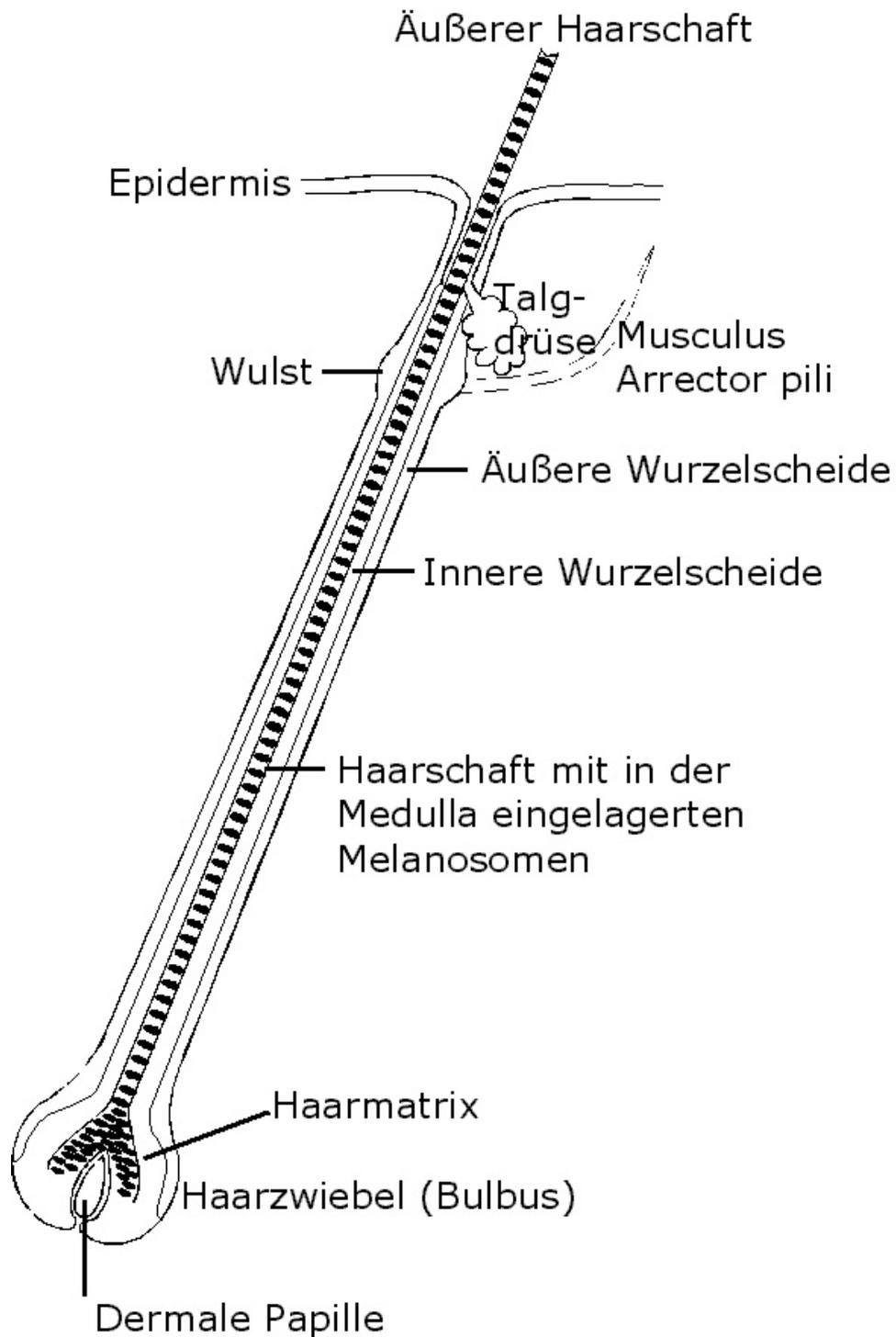


Abbildung 1-1, Ultrastruktureller Aufbau des Haarfollikels, des Haarschaftes

Follikels bei etwa 3300facher Vergrößerung. Im linken Bild wird der konzentrische Aufbau der differenzierten Zellagen deutlich. Das rechte Bild zeigt im Zentrum des Haarschaftes die Medulla. Am jeweils proximalen Pol der dort

eingeschlossenen Keratinozyten befinden sich Melaningranula. Diese Verteilung läßt den murinen Haarschaft im Lichtmikroskop gestreift erscheinen. Abbildung 1-2 zeigt die anatomische Übersicht des adulten Haarfollikels.



**Abbildung 1-2, Anatomie des Haarfollikels**

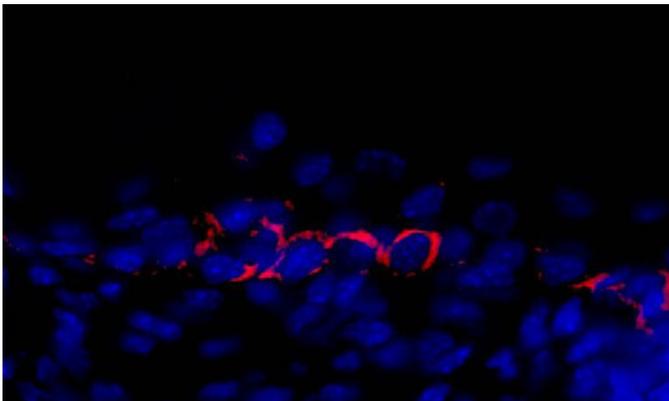
Das Haargebilde besteht aus Haarwurzel, Haarschaft und dem M. Arrector Pili (siehe Abbildung 1-2). Die Haarwurzel besteht aus dem Haarbulbus, der die Haarpapille umschließt und den konzentrisch angeordneten Haarwurzelscheiden. Die Talgdrüse mündet in den Haarkanal, knapp unterhalb der Epidermis. Der Haarbulbus ist das verbreiterte epidermisabgewandte Ende der Haarwurzel. Die Matrixzellen umschließen die in der Form stadienabhängige dermale Papille. Diese beiden Zellpopulationen sind unterschiedlichen Ursprungs und durch eine Basalmembran getrennt. Matrixkeratinozyten weisen eine außerordentlich hohe Proliferationsrate auf und bilden auf ihrem Weg an die Oberfläche durch verschieden stark ausgeprägte Differenzierung mehrere Schichten. Die äußere Wurzelscheide (ÄWS) besteht aus wenig differenzierten Matrixkeratinozyten. Sie ist von der Bindegewebsscheide (BGS) umgeben. Die Äußere Wurzelscheide umschließt die Innere Wurzelscheide (IWS), die aus der Huxley'schen und der Henle'schen Schicht und der Kutikula besteht. Diese Schichten keratinisieren auf verschiedenen Höhen im Haarfollikel, davon die Huxley'sche zuerst. Anhand des Differenzierungsgrades der einzelnen Lagen lässt sich auch bei den kleinen Bildausschnitten in der Elektronenmikroskopie die genaue Lage bestimmen. Die Kutikula des Haarschaftes ist zusammengesetzt aus einer dünnen Schicht abgeflachter, stark keratinisierter und widerstandsfähiger Zellen, die sich dachziegelartig um den Haarschaft legen. Die Schuppen der Haarkutikula sind mit den in Gegenrichtung orientierten inneren Rändern der kutikulären Zellen der inneren Wurzelscheide verzahnt. Der Kortex des Haarschaftes ist die tragende keratinisierte Struktur des Haarschaftes. Die kortikalen Zellen sind konzentrisch um die Medulla des Haares angeordnet.

Die Medulla des Haarschaftes besteht aus einer Reihe von Zellen, in deren proximalen Polen der Hauptteil der Melaningranula eingelagert ist. Die Polarisierung der Pigmente und die regelmäßige Anordnung der Zellkerne verleiht den Haarschaften der C57BL/6 Maus unter dem Mikroskop ein gestreiftes Aussehen. Lanugohaare besitzen keine Medulla. Wie auch die BGS und die dermale Papille ist der M. Arrector Pili mesenchymalen Ursprungs. Er besteht aus glatter Muskulatur, die bei Kontraktion den Haarschaft über dem Hautniveau aufrichtet. Gleichzeitig massiert er Talgdrüseninhalt in den Haarkanal. Die Talgdrüse ist eine aus Keratinozyten stammende holokrine Drüse, deren Inhalt aus Lipiden und Zellschutt besteht. Ihre flachen, randständigen Zellen proliferieren in das Lumen und differenzieren auf dem Weg zum Ausführungsgang aus. Dabei füllt sich die

Zelle mit Lipidtröpfchen, die nach und nach fast das gesamte Zytoplasma ersetzen. Das Sebum umschließt den Haarschaft ohne in ihn einzudringen und verteilt sich auf der Oberfläche der Epidermis.

### 1.1.1 Die Haarfollikelmorphogenese

Die frühe Entwicklung der Haarfollikel beginnt beim Menschen um den 3. Fetalmonat, beginnend mit der Haarfollikelentwicklung an den Augenbrauen, der Oberlippe und dem Kinn. Das übrige Haarkleid entsteht um den 4. Fetalmonat (Pinkus, 1958). Bei der Maus beginnt die Haarfollikelmorphogenese zunächst an den Vibrissae (den Schnauzhaaren) und greift dann auf die Wollhaare (Pelage) über. Unter den verschiedenen Subtypen der Haarfollikel (Vibrissae, Tylotriche und Pelage-Follikel (Sundberg, 1994)) sollen hier ausschließlich die Pelage-Follikel, die Mehrzahl der Haarfollikel des Fells, untersucht werden. Deren Entwicklung ist bei den meisten genauer untersuchten Säugern ausgesprochen ähnlich. Die Terminologie, vor allem die der frühen Stadien, ist sehr verwirrend durch Doppelbenennungen und Verwendung unterschiedlicher Stadieneinteilung. Daher wird im gesamten folgenden konsequent die Einteilung von Paus (Paus *et al*, 1999b), modifiziert nach Hardy, verwandt (vergleiche Abbildung 1-5).



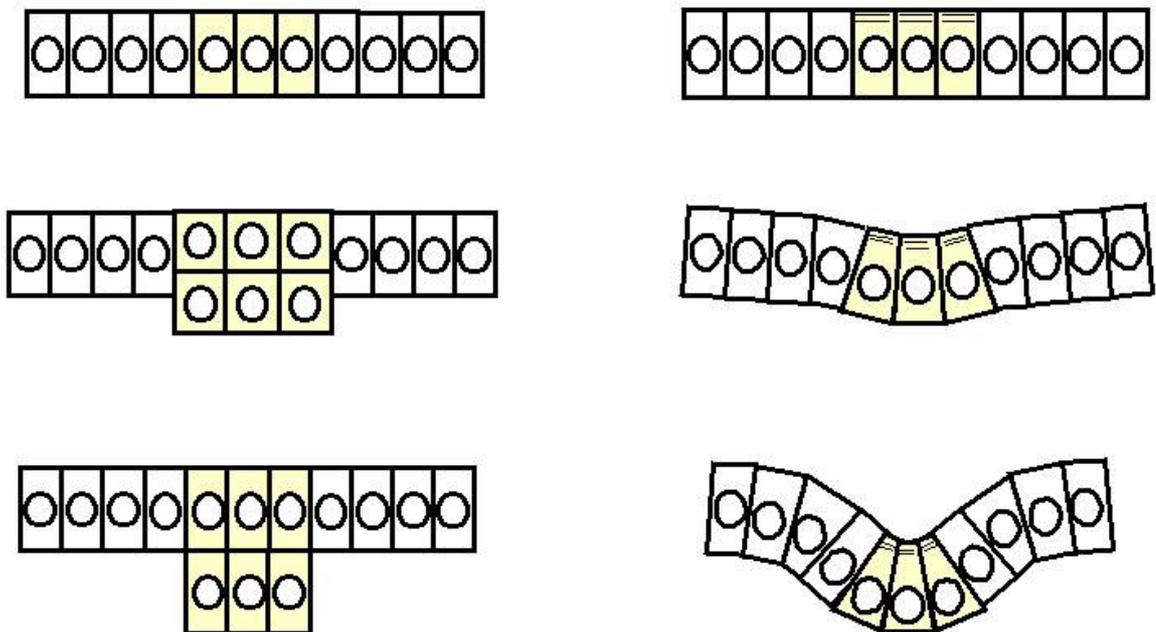
**Abbildung 1-3, TGFbetaRII-Immunreaktion (rot) im Stadium 0**

nachfolgenden Haarfollikelwachstums ausmachen (Paus *et al*, 1997) (siehe Abbildung 1-3). Der Haarkeim, Stadium 1, besteht in einer Verdichtung von Keratinozyten (im histologischen Schnitt etwa 3-6 Zellen) der basalen Zellschicht. Diese Zellen gewinnen eine ovale Form und richten sich mit ihrer Längsachse quer zur Epidermis auf. Dadurch entsteht eine leichte Vorwölbung der Epidermis in die Dermis. Direkt unter dieser epithelialen Verdickung findet sich eine leicht zunehmende Aggregation von Fibroblasten, die sich von den

Die embryonale murine Epidermis ist beim Auftreten der ersten Haarfollikelkeime mehrschichtig. Im Stadium 0 kann der Haarkeim morphologisch nicht ausgemacht werden, die Epidermis an dieser Stelle ist der umliegenden gleich. Durch immunhistochemische Anfärbung von Transforming growth factor beta Rezeptor II (TGF $\beta$ RII) läßt sich jedoch auch in diesem Stadium der Ort des

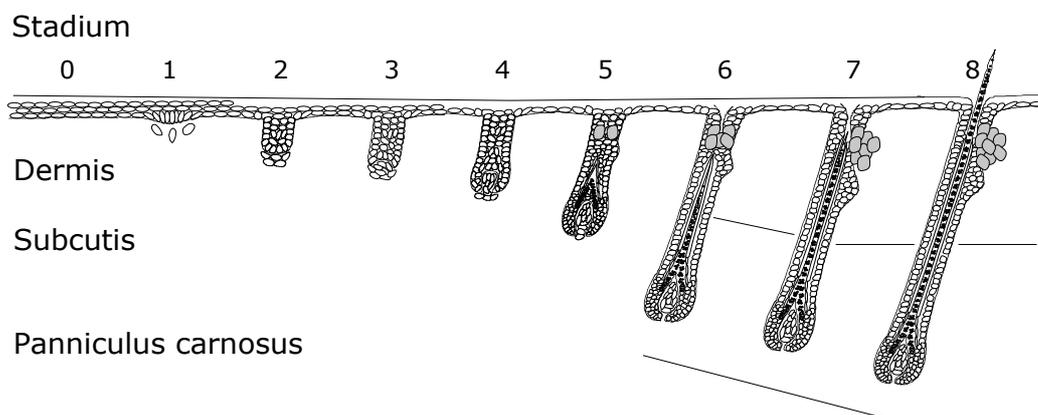
übrigen, reichlich vorhandenen Fibroblasten durch eine angedeutete gemeinsame Orientierung unterscheiden. Uneinigkeit herrscht darüber, ob die Vorgänge in der Epidermis denen des Korioms vorangehen, sie zeitgleich stattfinden oder sie ihnen nachfolgen (Danneel, 1931; Pinkus, 1958). Da beide Änderungen im sehr frühen Stadium nur andeutungsweise imponieren, wird sich diese Frage nicht durch alleinige Beobachtung klären lassen.

Im Stadium 2 gewinnt der Haarkeim an Masse, wächst in die Dermis vor und beginnt sich in einer anterior-posterioren Orientierung auszurichten. Bei diesem Vorwachsen in die Dermis zwischen Stadium 1 und 2 ist strittig, ob dieses durch Invagination der Epidermis in die Dermis geschieht (Fleischhauer, 1953; Chase, 1954) oder ein Ergebnis der hohen proliferativen Aktivität in diesem Stadium darstellt (Danneel, 1931). Es sei vorweggenommen, daß die hier gewonnenen Ergebnisse vor allem auf eine Formung durch Proliferation hinweisen, ebenso aber Elemente einer Invagination zu beobachten sind.



**Abbildung 1-4, Proliferation versus Invagination: Beruht die Bildung des Haarkeims auf der Proliferation epidermaler Keratinozyten in die Tiefe der Dermis oder auf einer Einstülpung der Epidermis?**

Im Stadium 3 beginnt die räumliche Organisation der Zellen des Haarzapfens. Die Keratinozyten gruppieren sich konzentrisch entlang der Längsachse (Robins and Breathnach, 1969), die sich zunehmend in anterior-posteriorer Orientierung ausrichten. Die Fibroblasten haben sich weiter aggregiert, an Zahl zugenommen und bilden nun die dermale Papille, die von den stark proliferierenden Keratinozyten zu umschließen begonnen wird. Weiteres Längenwachstum, die Bildung eines Bulbus und die weitere Umschließung der dermalen Papille kennzeichnen Stadium 4. Dabei beginnt auch die Entwicklung der Inneren Wurzelscheide, die in Stadium 5 wächst und differenziert. In diesem Stadium beginnt die Melaninproduktion in den peripapillären Melanozyten, ebenso entstehen in jungen Sebozyten die ersten Fettvakuolen. Proximal der Sebozyten wölbt sich das Haarbeet hervor. In Stadium 6 reicht der Haarfollikel bis in die Subcutis, der Haarschaft ist bis auf Höhe des Haarbeets (Wulst) vorgedrungen, die Zahl der Sebozyten nimmt zu und formt die Talgdrüse. Die dermale Papille ist nun fast vollständig umschlossen und nimmt eine längliche Form an. Stadium 7 ist gekennzeichnet durch weiteres Längenwachstum des Haarfollikels, Größenzunahme von Haarbeet und Talgdrüse. Der Haarschaft verläßt die Innere Wurzelscheide und steht nun im Haarkanal, ist aber noch nicht durch die Epidermis gebrochen. Im Stadium 8 ist der Follikel vollständig differenziert, der Haarschaft durchstößt die Epidermis

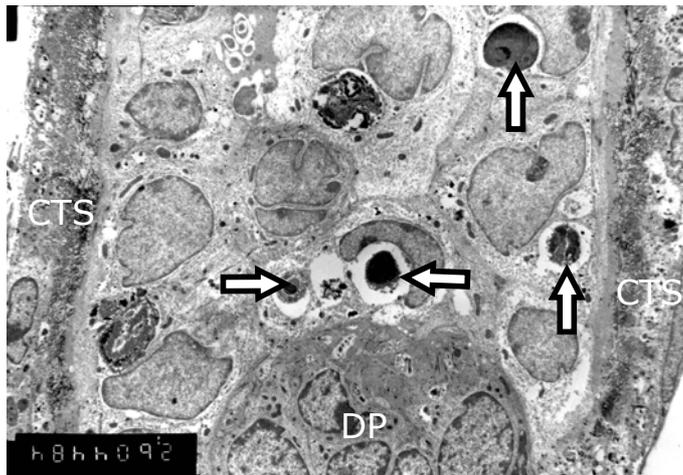


durchstößt die Epidermis (Paus *et al*, 1999b).

Im hier verwendeten Mausmodell sind am 3. Tag post partum (p.p.) 10% der Pelagefollikel im Stadium 8, am 5. Tag p.p. sind es 35% und am 9. Tag sind alle im Stadium 8 angelangt (Paus *et al*, 1998).

**Abbildung 1-5, Die Stadien der Haarfollikelmorphogenese**

### 1.1.2 Katagen



**Abbildung 1-6, Apoptose (Pfeile) im epithelialen Strang des Haarfollikels im späten Katagen**

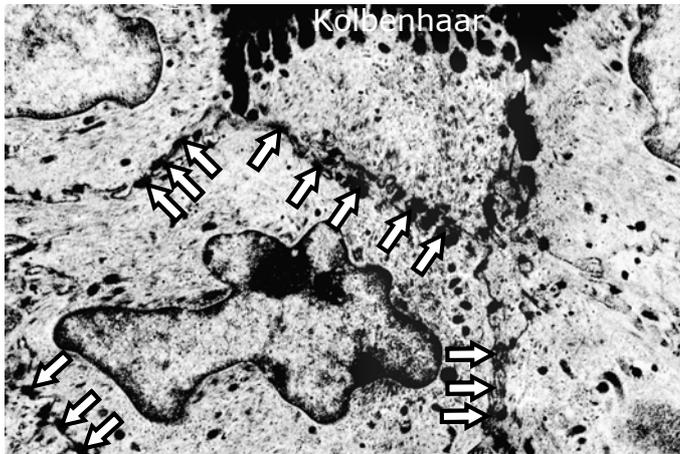
Das der Haarfollikelmorphogenese folgende Katagen bezeichnet den Eintritt in den Haarzyklus. Innerhalb weniger Tage kommt es zu einer massiven Organinvolution, an deren Ende ein auf einen Bruchteil seiner ursprünglichen Größe und ein auf seine permanenten Anteile reduzierter Haarfollikel steht. Aufgrund morphologischer Beobachtungen schloss Weedon (Weedon and Strutton, 1981), daß diesem

Gewebeabbau Apoptose zugrundeliegt (siehe Abbildung 1-6). Lindner et al. bestätigte Weedons ultrastrukturellen Nachweis durch TUNEL-Färbungen die zeigen, daß Keratinozyten Apoptose während normalem, als auch in pathologischem und in experimentell induziertem Katagen stattfindet (Lindner *et al*, 1997).

### 1.1.3 Telogen-Anagen

Am Ende der Katagenphase treten die Haarfollikel in einen Ruhezustand ein, das Telogen. Es dauert beim Menschen mehrere Monate und bei der weiblichen C57BL/6-Maus knappe 2 Wochen an. In dieser Phase scheinen die Follikel zu ruhen, es findet keine Haarproduktion statt. Die intrazelluläre Proteinproduktion ist gering, die Morphologie und Größe der Follikel bleibt in dieser Zeit unverändert (Roth, 1964; Camacho and Montagna, 1996). Der Haarschaft der vorangegangenen Wachstumsphase ist proximal des Talgdrüsenisthmus in der umliegenden äußeren Wurzelscheide verankert, deren Zellen untereinander durch eine große Anzahl kräftig ausgebildeter Desmosomen vernetzt sind (Roth, 1964); Camacho and Montagna, 1996) (siehe Abbildung 1-7). Dieser verbleibende Haarschaft wird Kolbenhaar genannt. Die Depilation eines Kolbenhaares führt zur Induktion einer erneuten Anagenphase (Ebling, 1976). Dieser Effekt

kann zur Synchronisierung des Haarzyklus genutzt werden (s. Kap. 3.3.1.1)  
Während es im Bereich des Haarkanals zu einigen wenigen



**Abbildung 1-7, Kolbenhaarverankerung und Desmosomen (Pfeile)**

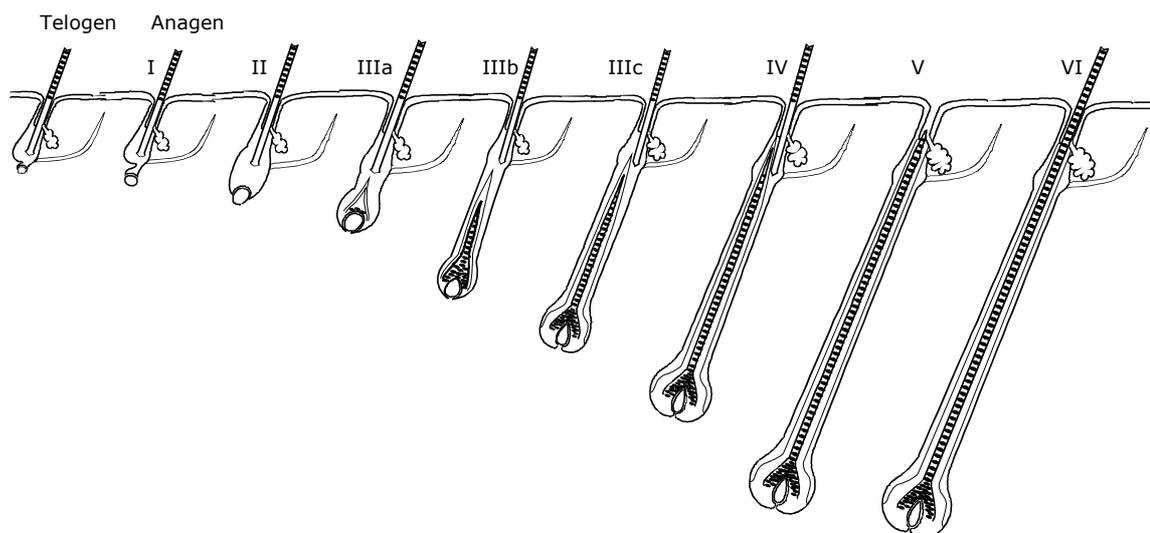
Mitosen kommen kann, deren Häufigkeit die der basalen Zellschicht der Epidermis nicht übersteigt, ist der unter dem Talgdrüsenisthmus gelegene Teil mitotisch inaktiv (Bullough and Laurence, 1958). Telogenhaut scheint einen nicht identifizierten Stoff zu enthalten, der die Telogenphase unterhält und die Anageninduktion inhibiert (Paus *et al*, 1990). Über die Art des Signals, das diese Inhibition durchbricht und die neue Anagenphase induziert, können nur Vermutungen angestellt werden. Eine der Theorien dazu besagt, daß während der Wachstumsphase Mitoseinhibitoren aus den Bulbuskeratinozyten langsam akkumulieren und bei Erreichen eines Schwellenwertes das Katagen induzieren. Während des Telogens wird die inhibitorische Substanz unter den Schwellenwert abgebaut, infolge Desinhibition kommt es zum erneuten Anagen (Chase, 1954). Eine andere Überlegung kommt zu dem Schluß, daß die Matrixkeratinozyten aus der im Haarwulst lokalisierten Stammzellpopulation stammen. Die mitotische Potenz dieser Keratinozyten sei genetisch determiniert. Nach einer bestimmten Anzahl von Teilungen verlieren sie die Fähigkeit zur Mitose und induzieren das Katagen. Erneute Migration von Zellen -ausgelöst durch ein Signal der DP- in den proximalen Anteil des Follikels aus der Stammzellpopulation beendet das Telogen und induziert Anagen (Cotsarelis *et al*, 1990).

Gleichwohl, nach dem Ende der Telogenphase beginnt der Haarfollikel durch massive Proliferation seine ursprüngliche Größe wiederherzustellen (vergleiche Abbildung 1-8). Die Initialphase, das Anagen I ist vom Telogen nur durch das Einsetzen mitotischer Aktivität im proximalen Haarfollikel und einer geringen Größenzunahme des epithelialen Stranges zu unterscheiden. Proliferierende Keratinozyten beginnen mit der Ausbildung des Bulbus und dem Umfassen der während des Katagens gerundeten dermalen Papille im Anagen II. Anagen III ist

Mitosen kommen kann, deren Häufigkeit die der basalen Zellschicht der Epidermis nicht übersteigt, ist der unter dem Talgdrüsenisthmus gelegene Teil mitotisch inaktiv (Bullough and Laurence, 1958). Telogenhaut scheint einen nicht identifizierten Stoff zu enthalten, der die Telogenphase unterhält und die Anageninduktion inhibiert (Paus *et al*,

gekennzeichnet durch eine moderate Massenzunahme des Haarfollikel, der Bildung der inneren Wurzelscheide und der Wiederaufnahme der Melanogenese. Die dermale Papille wird vollständig umschlossen. In den Stadien IIIa und IIIb nimmt der Haarfollikel weiter an Größe zu, der Haarschaft erreicht das Kolbenhaar. Die dermale Papille nimmt wieder die charakteristische längliche Form ein. Die Unterstadien des Anagen III verlaufen sehr rasch und sind dementsprechend selten zu beobachten. Sie werden daher nach alter Klassifikation zum Anagen III zusammengefaßt. Im Stadium IV erreicht der Haarschaft den Talgdrüsenisthmus, und abgesehen vom verbleibenden Kolbenhaar gewinnt der Anagenfollikel eine große Ähnlichkeit mit dem Morphogenesestadium 6. Das Kolbenhaar wird in Anagen 5 ausgestoßen, der neugebildete Haarschaft tritt in den Haarkanal ein und das Längenwachstum des Follikels setzt sich fort.

### Telogen-Anagen



**Abbildung 1-8, Entwicklung des Anagen aus der Telogenphase**

Im Anagen VI hat der Haarfollikel seine endgültige Größe erreicht, der Haarschaft ist durch die Epidermis gebrochen.

Am Tag 0 nach Induktion eines neuen Haarzyklus mittels Depilation der Telogen-Kolbenhaare befinden sich noch alle Haarfollikel im Telogen, am 1. Tag post depilationem (p.d.) sind die meisten Follikel im Anagen I, am 2. Tag p.d. im Anagen II. In den folgenden Tagen streut die Anagenentwicklung intraindividuell, am 8. Tag p.d. befinden sich bereits reichlich Follikel im Anagen VI, während

andere noch im Anagen 3-4 sind. Am Tag 12 p.d. sind alle Follikel im Anagen VI, am 14. Tag p.d. sieht man bereits einige wenige Haarfollikel in den frühen Stadien des Katagens.

Auf dem Skalp des erwachsenen Menschen befinden sich zwischen 90 000 – 150 000 Haare (Blonde ca. 150 000, Schwarzhaarige ca. 100 000, Rothaarige ca. 90 000), die Haardichte liegt zwischen 175 – 300/cm<sup>2</sup>. Die Haardicke beträgt um die 0,06 – 0,12 mm, die Wachstumsgeschwindigkeit liegt bei 0,27 – 0,45 mm/d (Camacho and Montagna, 1996). Nur in den ersten Lebensmonaten ist der Haarzyklus beim Menschen teilweise synchronisiert. Später befinden sich ca. 90% in der Anagenphase, ca. 10% im Telogen und nur ca. 2% im Katagen. Dieser asynchrone Zyklusverlauf der individuellen Haarfollikel und nicht zuletzt die Schwierigkeiten bei der Gewebeakquise machen die stadienbezogene Haarforschung an humanen Haarfollikeln außerordentlich langwierig. Wegen zahlreicher Vorteile wurde dazu das C57BL/6 Mausmodell gewählt, das in Kap. 3.2 näher beschrieben wird.

Eine graphische Zusammenfassung der Morphogenese und des anschließenden Haarzyklus findet sich in Abbildung 1-9.

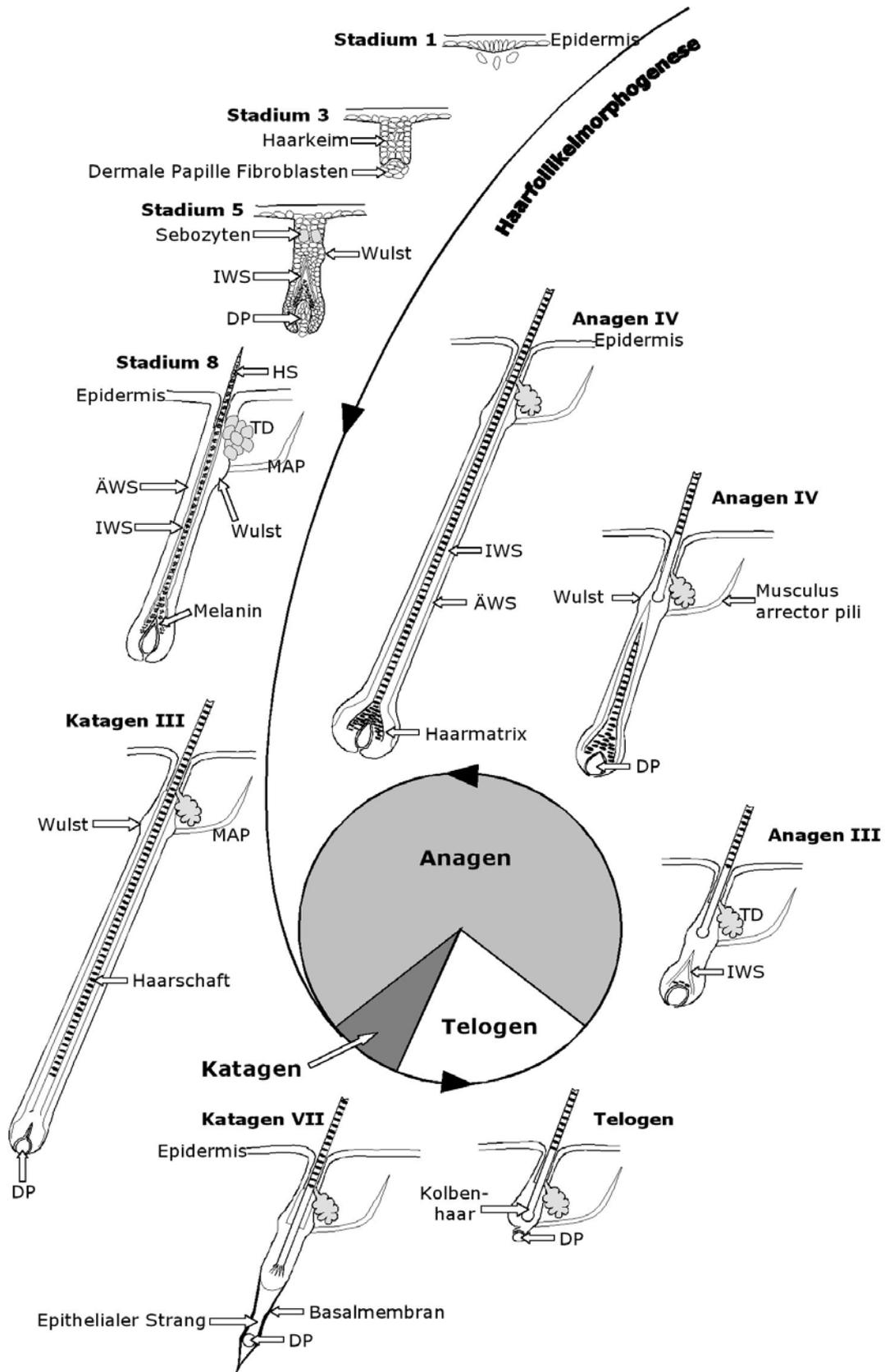
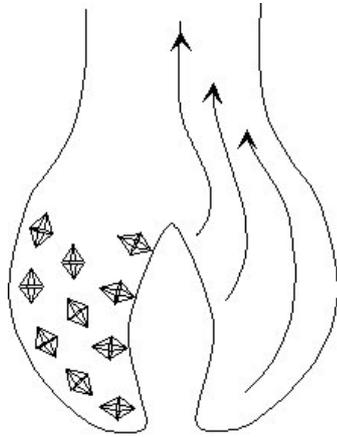


Abbildung 1-9, Ausgewählte Stadien der Morphogenese und des Zyklus

## 1.2 Proliferation

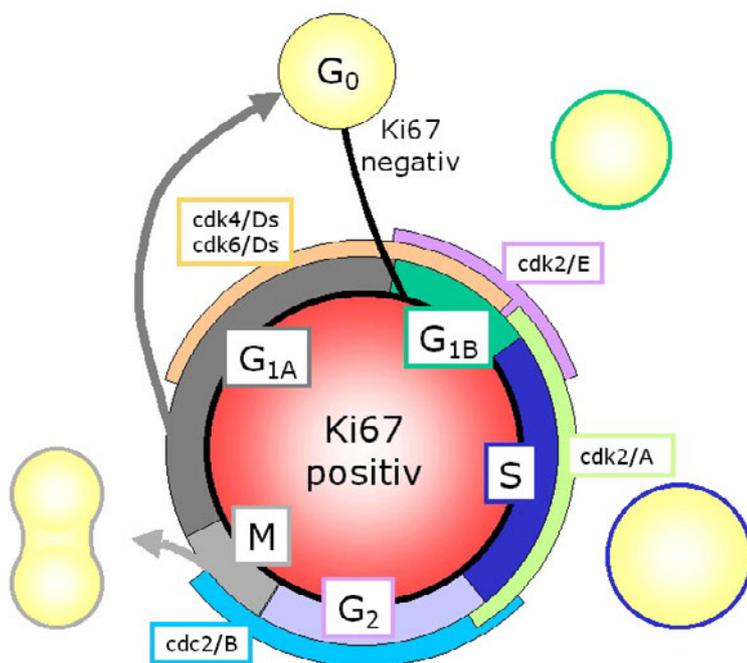


**Abbildung 1-10, Schema der Lokalisation der Mitosefiguren und der Migrationsrichtung der Matrixkeratinozyten (nach Bullough and Laurence, 1958)**

Der wachsende und produzierende Haarfollikel weist eine ausgesprochen hohe Proliferationsrate auf, wie sie im adulten Säuger physiologischerweise nur noch im Darmepithel und im Knochenmark vorkommt. In wachsenden und Haarschaftproduzierenden Haarfollikeln finden sich auch ohne vorherige Colchicinarrestierung im histologischen Präparat stets einige Mitosefiguren, vor allem im Bulbus (siehe Abbildung 1-10). Als erster beschrieb Giovannini die Mitosen des Haarbulbus in Ihrer charakteristischen Anordnung um die dermale Papille (Giovannini, 1890). Dabei beträgt die Mitosedauer lediglich 0,8 Stunden (Weinstein and Mooney, 1980), nach Untersuchungen von Bullough gar nur 0,25-0,5 Stunden (Bullough and Laurence, 1958). Unter einer vorangegangenen 4-stündigen colchicininduzierten Mitosehemmung beträgt der Anteil der mitotischen Matrixkeratinozyten 30%. Daraus ergibt sich, daß zu jeder Stunde 7,5% der Matrixkeratinozyten in die Mitosephase eintreten. Diese hohen Teilungsraten unterliegen keinem Tagesrhythmus und bleiben auch in Hungerperioden und bei Erschöpfungszuständen stabil (Bullough and Laurence, 1958). Die große Wachstumsfraktion im Bulbus ist – ähnlich wie bei anderen hochproliferativen Geweben – für die hohe Empfindlichkeit des Haarfollikels gegenüber Zytostatika und Radiotherapie verantwortlich (Paus *et al*, 1994c; Schilli *et al*, 1998; Lindner *et al*, 1997).

Im produzierenden Follikel sind die Mitosefiguren typischerweise in der Haar-matrix bis zur Höhe der Papillenspitze lokalisiert (siehe Abbildung 1-10). Die Tochterzellen wandern in Richtung Epidermis, wo sie je nach Herkunft auf verschiedenen Höhen des Haarfollikels differenzieren und so einen Teil der inneren Wurzelscheide, der Cuticula oder des Haarschaftes bilden (Danneel, 1931; Bullough and Laurence, 1958).

Im Gegensatz zu den stark proliferierenden Matrixkeratinozyten bleiben die angrenzenden mesenchymalen Gewebe mitotisch weitgehend stumm. Zwar verändern auch die dermale Papille (DP) und, gezwungen durch die zyklusabhängigen Längenveränderungen des Follikels, die Bindegewebs-scheide (BGS) ihre Größe und Zellzahl, doch wurde in Untersuchungen an adulten Haarfollikeln keine proliferative Aktivität in den Fibroblasten in vivo von DP und BGS gefunden (Bullough and Laurence, 1958). Spätere Studien, die auch die Telogenphase einschlossen, kommen mit verfeinerten Methoden ([<sup>3</sup>H]Thymidin- und BrdU (Bromodeoxyuridin)-Inkorporation) zu ähnlichen Ergebnissen (Silver and Chase, 1970; Tezuka *et al*, 1990). Die Verfeinerung in diesen Methoden beruht darauf, daß die damit detektierte S-Phase des Zellzyklus die Dauer der Mitosephase um das 10-fache übertrifft (Weinstein and Mooney, 1980). Cyclinabhängige Kinasen (cyclin dependent kinases, CDK), die ebenfalls zur Proliferationsdetektion



herangezogen werden können, sind durch teilweise etwas längere Expressionsdauer ein wenig sensitiver, aber auch sie decken nur einen Teil des Zyklus ab (siehe Abbildung 1-11). Hingegen deckt der Antikörper Ki67, der ein proliferationsassoziiertes nukleäres Antigen erkennt, den gesamten Zellzyklus ab; jede Zelle, die aus der G<sub>0</sub>-Phase austritt, kann so immunhistochemisch sichtbar gemacht werden (Gerdes *et al*, 1991; Sawhney and Hall, 1992). Durch seine hohe Sensitivität erlangte Ki67 prognostische Bedeutung in der Beurteilung von Malignomen.

**Abbildung 1-11, Zellzyklus, Ki67-Positivität, cyclin-dependent kinases und die vergesellschafteten Zykline**

prognostische Bedeutung in der Beurteilung von Malignomen.

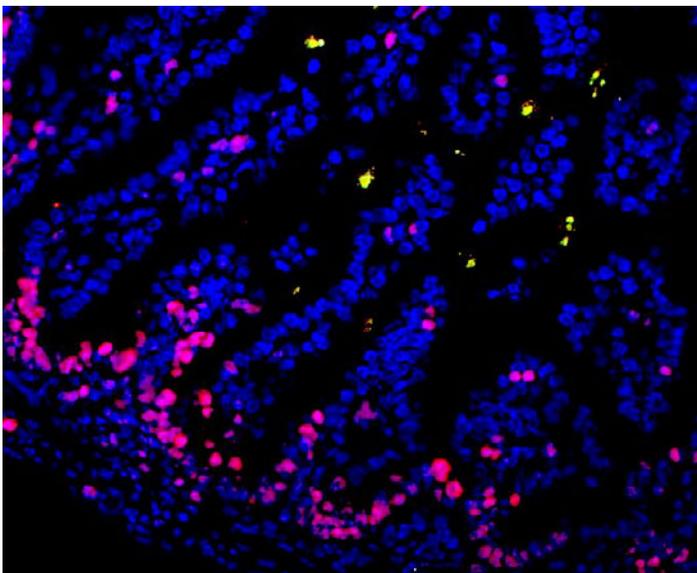
(Weiss *et al*, 1987; Bodey *et al*, 1997). Doch die zyklusumgreifende Präsentation des proliferationsassoziierten Antigens und seine Detektion durch den Ki67-Antikörper erlaubt auch Aussagen über das Proliferationsverhalten von niedrigproliferativen Geweben, die sich durch die Unzulänglichkeiten der früheren Methoden der Beobachtung entzogen.

## 1.3 Apoptose

Eukaryotische Zellen können auf verschiedenen Wegen zugrunde gehen. Noxen, die die Zelle oder einen Zellverband schwer schädigen, führen meist zum nekrotischen Zelltod. Nekrose ist gekennzeichnet durch Anschwellen der Zelle, Membranschäden führen zum Verlust von Kalzium und Natrium, Umkippen des Wasserhaushalts und Azidose. Die Azidose hat Chromatinverklumpungen zur Folge. Die Kerne erscheinen pyknotisch und dunkel. Mitochondrien, endoplasmatisches Retikulum und Lysosomen schwellen an und platzen schließlich. Freigesetzte lysosomale Enzyme führen zu weiterer Autolyse der Zelle, die letztendlich ihre Integrität verliert und durch ihren freigesetzten Inhalt entzündliche Reaktionen in ihrer Umgebung hervorruft. Nekrose ist ein passiver und immer pathologischer Prozeß, der auf einen letalen Stimulus hin einsetzt und den ursprünglichen Schaden nicht zu begrenzen vermag, ihn gar vermehrt. Darüberhinaus können eukaryotische Zellen sich mittels eines genetisch determinierten Zelltodprogramms selbst zerstören. Dieser strukturierte und energieabhängige Prozeß des Abbaus von zellulären Strukturen wird Apoptose (aus dem griechischen für "hinabfallen", im Sinne von fallendem Laub) genannt und ist durch spezifische morphologische und biochemische Veränderungen charakterisiert. Im Gegensatz zur Nekrose findet Apoptose in der Regel Einzelzellen statt. Apoptose ist die kontrollierte und begrenzte Auslöschung geschädigter oder überzähliger Zellen, ein Regulierungsmechanismus der in Säugern, Insekten, Nematoden, Amphibien und Pflanzen zur Anwendung kommt (Raff, 1992; Vaux, 1993). Dabei kommt es im Gegensatz zur Nekrose nicht zur unkontrollierten Freisetzung von Zellbestandteilen. Vielmehr werden alle Zellbestandteile als membranumhüllte Vesikel abgegeben und von benachbarten Zellen oder Makrophagen phagozytiert. Programmierter Zelltod ist ein fundamentales Ereignis in der Embryonalentwicklung, der Ausformung des Embryos und der Larve, und der Organisation des Immun- und Nervensystems (Glücksman, 1951; Lockshin and Williams, 1965; Saunders, 1966). Apoptose dient der Gewebshomöostase des adulten Organismus und bei der Eliminierung geschädigter oder infizierter Zellen (Kerr *et al*, 1972; Raff, 1992; Vaux *et al*, 1994; Bellamy *et al*, 1995; Potten *et al*, 1997). Evolutionsbiologisch ist Apoptose in den verschiedenen Organismen und Zelltypen stark konserviert (Vaux *et al*, 1994; Vaux and Strasser, 1996; Horvitz, 1999), was die Ausbildung von

Gegenmaßnahmen mancher Erreger zur Folge hatte. So inhibieren z.B. CrmA (SPI-2, serine protease inhibitor), vom Kuhpockenvirus synthetisiert, oder das Baculovirus p35-Genprodukt Schlüsselenzyme der Apoptose, die Caspasen (Ray *et al*, 1992; Bertin *et al*, 1996; Ekert *et al*, 1999). Damit verhindern sie den vorzeitigen Tod der Zelle, der auch ihrem eigenen Lebenszyklus ein Ende setzen würde. Durch ihr punktuellles Eingreifen in den Ablauf der Apoptose trugen beide Erreger zur (immer noch nicht abgeschlossenen) Entschlüsselung der Steuerung der Apoptose bei.

Entscheidende Bedeutung bei der Erforschung der Apoptose kommt der Nematode *Caenorhabditis elegans* zu. Der Beobachtung in jeder Entwicklungsphase leicht zugänglich ließ sich an ihr die Bedeutung der Apoptose in der Embryonalentwicklung und der programmgemäße Ablauf des Zelltodes studieren. 12% (131) aller Zellen (1090) werden im Lauf der Entwicklung durch Apoptose eliminiert. 113 von insgesamt 671 Zellen gehen in der 14-stündigen Embryogenese unter, die Mehrzahl davon 250 bis 450 Minuten nach der Fertilisation (Sulston *et al*, 1983). Im postembryonalen Stadium entwickeln sich weitere 419 Zellen, von denen 18 durch Apoptose untergehen (Sulston and Horvitz, 1977). Damit war bewiesen, daß programmierter Zelltod integraler Bestandteil frühester Entwicklung ist und streng reguliert selektiv formend in sie eingreift.

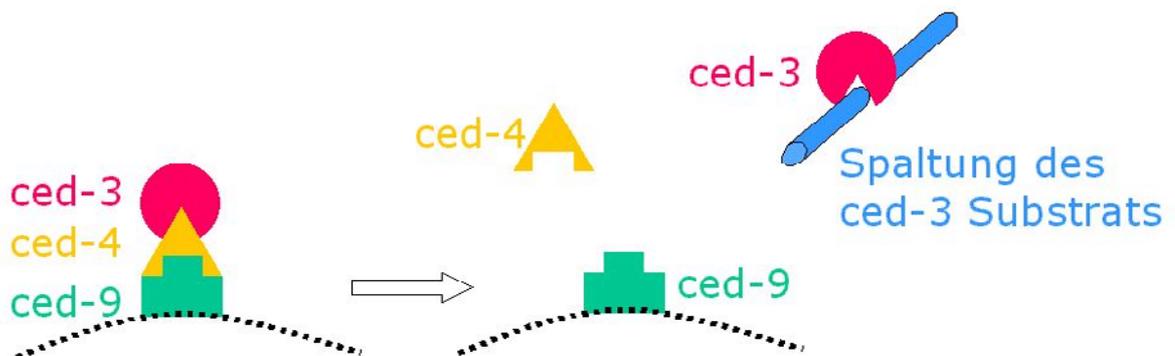


**Abbildung 1-12, Darmmukosa und -lumen im Mausembryo, (grün-Apoptose/TUNEL-Färbung, rot-Proliferation/Ki67-Antigenmarkierung) am 18. Tag nach Gestation.**

Weitere, bekannte Beispiele für das Vorkommen von Apoptose in der Entwicklung ist die Ausformung der Finger durch Elimination des interdigitalen Gewebes (Hammar and Mottet, 1971; Garcia-Martinez *et al*, 1993), die Entwicklung der Darmmukosa (Harmon *et al*, 1984) (siehe Abbildung 1-12) oder die Regression von Larvenorganen in der Kaulquappe (Kerr *et al*, 1974).

Untersuchungen an *C. elegans* trugen auch zur Aufklärung der

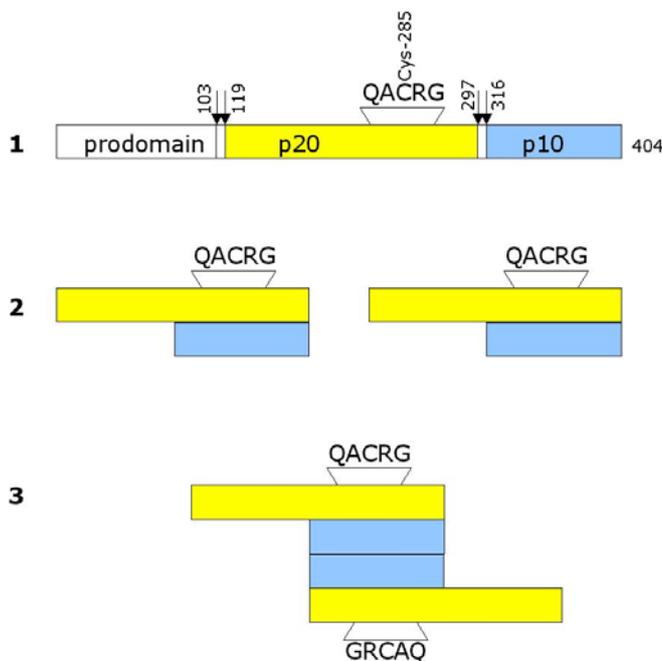
genetischen und biochemischen Hintergründe der Apoptose und deren evolutionsbiologischer Konservierung bei. Drei Gene (*ced-3*, *ced-4* und *ced-9*) wurden isoliert, die am programmierten Zelltod maßgeblich beteiligt sind und deren Wirkung an *lf* (loss-of-function) und *gf* (gain-of-function) Mutanten untersucht wurde. Dabei stellte sich heraus, daß homozygote *ced-9 lf* Mutanten außerordentlich hohe Apoptoseraten aufwiesen und noch im Embryonalstadium starben. *Ced-9 gf* –Mutanten wiesen weniger Apoptose auf. Waren in den *ced-9 lf* Mutanten die Gene *ced-3* und *ced-4* ebenfalls supprimiert, war die Apoptoserate erniedrigt. Überexpression von *ced-3* oder *ced-3* und *ced-4* führte zu massiv erhöhter Apoptose, *ced-4 gf* allein hingegen nicht (Hengartner *et al*, 1992; Hengartner and Horvitz, 1994b). Aus diesen Beobachtungen schloß man, daß *ced-9* normalerweise die Zelle vor Apoptose schützt, *ced-3* und *ced-4* hingegen Apoptose fördern. Dabei ist *ced-3* in der Lage, autonom pro-apoptotisch zu wirken, *ced-4* benötigt *ced-3* um Apoptose zu induzieren (Yuan and Horvitz, 1990; Shaham and Horvitz, 1996). Daraus wurde folgendes Modell entwickelt: Das inaktive mitochondrienmembrangebundene *ced-9/ced-4/ced-3* Trimer dissoziiert auf ein Signal hin, das *ced-3* aktiviert. Die Spaltung des *ced-3* Substrats geht der weiteren Signalkaskade in die Apoptose voran (Chinnaiyan *et al*, 1997) (siehe Abbildung 1-13).



**Abbildung 1-13, Modell der Wirkungsweise von *ced-3,-4,-9***

Diese drei Gene haben also in der Regulation der Apoptose bei *C. elegans* eine Schlüsselfunktion. Weitere *ced*-Gene (*ced-1,-2,-5,-6,-7,-10*) wurden identifiziert, sie dienen in späteren Stadien der Apoptose zur endozytotischen Aufnahme der apoptotischen Körperchen in benachbarte Zellen (Hedgecock *et al*, 1983). In Mammalia ist die Regulation weitaus differenzierter und auch komplizierter. Dennoch finden sich die Regelwege der Apoptose evolutionsbiologisch konserviert in Säugern wieder. Mit Apaf-1 wurde ein Homolog des *ced-4* Gens gefunden (Zou

*et al*, 1997), die pro-onkogene *bcl-2* Familie entspricht *ced-9* (Vaux, 1993; Hengartner and Horvitz, 1994a) und *ced-3* wurde als ICE (interleukin 1 $\beta$  converting enzyme) identifiziert, das als erste einer Reihe von Caspasen (**cysteine aspartat-specific proteinase**) entdeckt (Ceretti *et al*, 1992; Yuan *et al*, 1993; Miura *et al*, 1993); Thornberry and Molineaux, 1995) und Caspase 1 benannt wurde (Alnemri *et al*, 1996). Die humane Caspase-1 ist zu 29% mit dem *ced-3*-Protein identisch, regional bis zu 43% (Yuan *et al*, 1993). In hochkonservierten Regionen befindet sich das Pentapeptid QACRG mit dem aktiven Zentrum Cys-285 (siehe Abbildung 1-14), das die proteolytische Aktivität der Caspase-1 definiert (Schwartz and Milligan, 1996). Zwei weitere auf p20 liegende Epitope (His-237 und Gly-238) sind hoch konserviert.



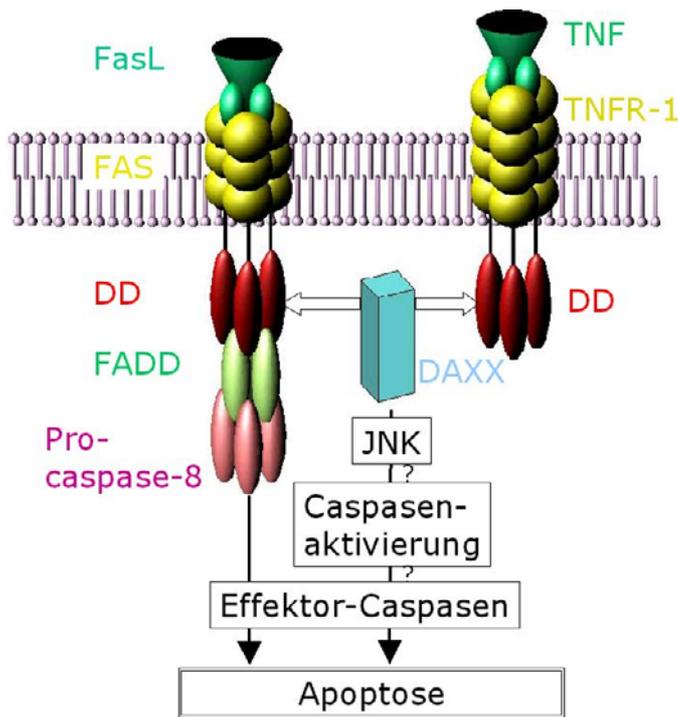
**Abbildung 1-14, Caspase-1: Vom Proenzym (1) zum aktiven Enzym (3)**

säuren große aktive Polypeptid IL-1 $\beta$  (17,5kD) frei. Das abgespaltene N-terminale Proenzym verstärkt Fas-medierte Apoptose, vermutlich durch katalytische Aktivierung von Caspase-8 (Tatsuta *et al*, 2000).

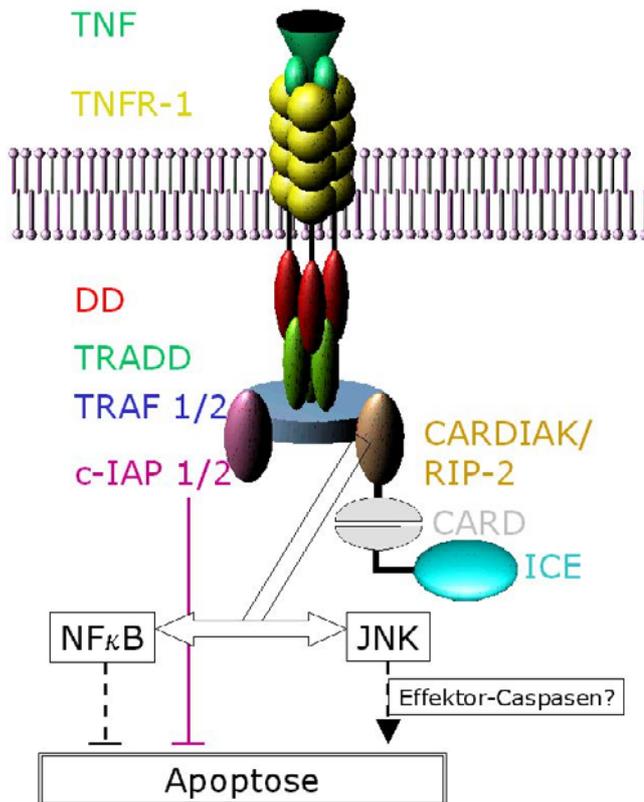
Caspasen greifen verstärkend in den Ablauf der Apoptose ein, sie sind in die Signaltransduktionskaskaden nahezu aller apoptoseauslösenden Rezeptoren integriert. Dabei funktioniert Caspase-8 als Initiatorprotease, die die als Verstärkerprotease dienende Caspase-1 spaltet, die ihrerseits eine Reihe Effektorproteasen aktiviert (unter anderem Caspase-3, Caspase-6, Caspase-7).

Alle Caspasen werden als inaktive Proenzyme exprimiert, die durch proteolytische Spaltung an Arg (Caspase-1: 103-119, 297-316) aktiviert werden, indem das N-terminale Proenzym abgespalten und die Untereinheiten p20 und p10 freigesetzt werden (Walker *et al*, 1994). P10 und p20 oligomerisieren mit 2 weiteren dissoziierten Untereinheiten zum aktiven Tetramer (siehe Abbildung 1-14). Aktive Caspase-1 spaltet den 31kD Präkursor von IL-1 $\beta$  zwischen Asp-116 und Ala-117 und setzt das 153 Amino-

Apoptose kann durch eine Vielzahl von äußeren und inneren Faktoren ausgelöst werden: u.a. sind Glukokortikoide (z.B.: Dexamethason; Chauhan *et al*, 1997), Chemotherapeutika (z.B. Doxorubicin Cece *et al*, 1996 oder Cyclophosphamid Meyn *et al*, 1994), ultraviolette Strahlung (Schwarz *et al*, 1995), Wachstumsfaktoren (z.B. Epidermaler Wachstumsfaktor Hollis and Chapman, 1987), zytotoxische Lymphozyten sowie Zytokine (z.B. Tumor Nekrose Faktor Ware *et al*, 1996) starke Apoptoseinduktoren. Unter einer Vielzahl apoptoseinduzierender, meist membranständiger Rezeptoren, sind Fas und TNFR (siehe Abbildung 1-15 und Abbildung 1-16, vereinfachte Darstellungen) die bestbeschriebenen. Die Aktivierung dieser Rezeptoren erfolgt über die Trimerisierung durch den entsprechenden Liganden, was intrazellulär die Bindung des Kopplungsproteins FADD (Fas-associated death domain protein) an die DD (death domain) des Rezeptors zur Folge hat. An diesen Komplex bindet die Caspase-8 (beim TNFR-1 bindet zusätzlich TRADD (TNFR1-associated death domain protein)) und aktiviert die Effektorproteasen, die die Apoptose unumkehrbar einleiten. Dieser Weg ist anhand des Fas-Rezeptors in Abbildung 1-15 dargestellt. Eine andere Möglichkeit der Signaltransduktion durch den TNFR ist die Bindung von TRADD and die DD nach Trimerisierung des TNFR durch TNF (siehe Abbildung 1-16). An diesen Komplex koppelt sich TRAF (TNFR-associated factor), das mit zwei Signalproteinen interagieren kann: cIAP (cellular inhibitor of apoptosis) inhibiert nach Bindung an TRAF über Herunterregulation von Caspasen die Auslösung der Apoptose, möglicherweise mediiert von der Aktivierung von NF- $\kappa$ B (nuclear factor  $\kappa$ B) (Rothe *et al*, 1995; Uren *et al*, 1996; Wang *et al*, 1998). TRAF kann auch mit RIP2 (receptor-interacting protein oder CARDIAK, (CARD-containing interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme (ICE=Caspase-1) associated kinase) interagieren, über dessen CARD (caspase-recruiting domain) es mit Caspase-1 gekoppelt wird, die dabei proteolytisch aktiviert wird (McCarthy *et al*, 1998; Thome *et al*, 1998). In der Folge werden NF- $\kappa$ B und JNK (Jun N-terminal kinase) aktiviert (Liu *et al*, 1996; Arch *et al*, 2000; Chainy *et al*, 2000), die als Apoptoseregulatoren gelten. Der Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B ist in der Lage die Transkription einer Reihe von Proteinen zu initiieren, die apoptoseinhibierende Effekte haben, oder apoptosefördernde Caspasenaktivierung zu blockieren (Wang *et al*, 1996; Wang *et al*, 1998). Die Rolle von JNK bezüglich der Apoptoseinduktion ist umstritten. Sicher ist, daß JNK nicht direkt apoptoseinduzierend wirkt, jedoch JNK-Aktivierung, abhängig vom



**Abbildung 1-15, Mögliche Signaltransduktionskaskaden, initiiert durch FasL oder TNF**

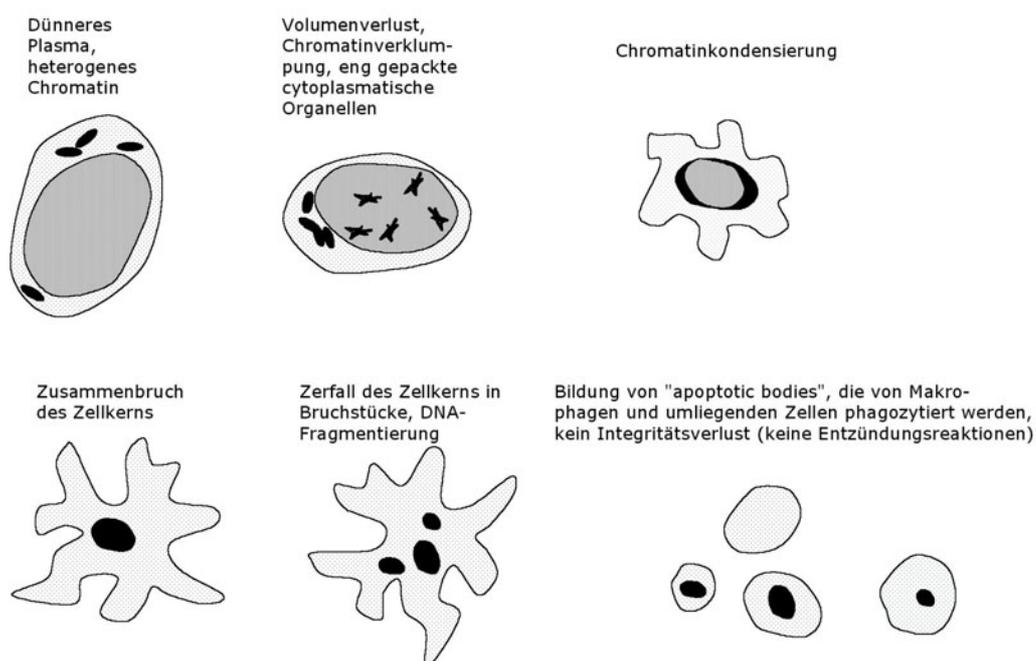


**Abbildung 1-16, Weitere Signaltransduktionswege, initiiert durch TNF**

vorhergehenden Aktivierungsweg, mit vermehrter Apoptose einhergeht (Frisch *et al*, 1996; Chen *et al*, 1998; Herr *et al*, 1999; MacFarlane *et al*, 2000; Eby *et al*, 2000). Diese Annahme wird durch eine weitere, durch DAXX (death domain associated protein) initiierte Signalkaskade, in der JNK eine Schlüsselrolle in der Apoptoseinduktion spielt, unterstützt. Der genaue auslösende Weg bleibt unklar (Yang *et al*, 1997; Chang *et al*, 1998; Baker and Reddy, 1998) (siehe Abbildung 1-15).

Der Zusammenhang zwischen JNK-Aktivierung, DAXX, RIP und Apoptose wird in neueren Publikationen kontrovers diskutiert (Virdee *et al*, 1997; Lenczowski *et al*, 1997; Villunger *et al*, 2000; Perlman *et al*, 2001; Wu *et al*, 2002). Am Ende all dieser Signalkaskaden steht der unumkehrbare Suizid der Zelle, wiederum unter zentraler Beteiligung von Caspasen. Vor allem die Caspasen-3,-6,-7 haben eine große Anzahl unterschiedlicher Substrate (z.B.: Lamin, Aktin, Fodrin,

PARP (Poly(ADP-Ribose) Polymerase), DNA-PK (DNA-dependent protein kinase), Steroidrezeptoren, Histone, Topoisomerasen), die das Zytoskelett und andere essentielle Proteine der Zelle zerstören (Lazebnik *et al*, 1994; Tewari *et al*, 1995; Song *et al*, 1996 Casciola-Rosen *et al*, 1996; Cryns *et al*, 1996). Die Aktivierung von ionenabhängigen Endonukleasen führt zur Fragmentierung der zellulären DNS, zunächst in große Bruchstücke von 50-200 Kilobasen und nachfolgend in kleinere Monomere und Multimere in der Größe von Nukleosomen ca. 180-200 Basenpaaren (Wyllie *et al*, 1980; Tomei and Cope, 1991; Cotter and Martin, 1996). Zusammen führen diese katabolen Prozesse zu den morphologisch sichtbaren Veränderungen der apoptotischen Zelle. Die morphologischen Charakteristika der Apoptose (siehe Abbildung 1-17) umfassen die Schrumpfung der Zellen unter Erhalt der Organellen, Margination von Chromatin, die Kernkondensation und -fragmentation. Die Zell-Zellkontakte gehen verloren, die Plasmamembran stülpt sich aus und schnürt sich ab. Diesem Vorgang folgt eine Fragmentation der Zellen in membranumhüllte apoptotische Körperchen, die später von benachbarten Zellen, meist von Makrophagen phagozytiert werden, ohne daß eine Entzündungsreaktion stattfindet. Die DNS-Fragmentierung und die Morphologie der Zellen wurden in dieser Arbeit zur Identifizierung apoptotischer Zellen herangezogen. Erstere wurde mit der TUNEL- HOECHST33342-Färbung , letztere durch Transmissionselektronenmikroskopie und hochauflösender Lichtmikroskopie detektiert. Diese Methoden sind im folgenden Kapitel "Materialien, Tiere und Methoden" eingehend beschrieben.



**Abbildung 1-17, Morphologische Veränderungen während der Apoptose**

## 1.4 Proliferation und Apoptose im Haarzyklus

"Die Entwicklung der Haare war schon verschiedentlich Gegenstand eingehender Untersuchungen; es könnte daher zunächst überflüssig erscheinen, daß das Thema hier noch einmal angeschnitten wird" schrieb R. Danneel 1930 in seinem Beitrag "Die Entwicklung der Haare bei der Ratte" (Danneel, 1931). Er befand, daß "über wesentliche Einzelheiten der Haarentwicklung und des Haarwechsels doch noch zahlreiche Unklarheiten und Widersprüche bestehen" und untersuchte daraufhin die Morphogenese der Haarfollikel mit den ihm zu Verfügung stehenden Mitteln auf das Genaueste. In den folgenden Jahrzehnten wurde die Haarfollikelentwicklung, im Zuge der Entdeckung neuer Methoden und des Erscheinens neuer Fragestellungen, immer wieder unter neuen und alten Aspekten untersucht (Gibbs, 1941; Hardy, 1949; Davidson and Hardy, 1952; Fleischhauer, 1953; Chase, 1954; Montagna and van Scott, 1958; Pinkus, 1958). Und dennoch bestehen nach wie vor "zahlreiche Unklarheiten und Widersprüche". Sie alle auszuräumen soll und kann nicht Aufgabe dieser Arbeit sein, doch gab die hergebrachte Ansichten umstürzende Entdeckung, daß der programmierte Zelltod, die Apoptose, ein grundlegender Bestandteil embryonaler Entwicklung ist (Glücksmann, 1951; Saunders, 1966; Kerr *et al*, 1972), den Anlaß, an dieser Stelle erneut auf die Entwicklung der Haare einzugehen.

Embryonalentwicklung und Organogenese sind streng reguliertes und genau ausgewogenes Zusammenspiel von Zellproliferation, Zellpolarisation, Differenzierung und programmiertem Zelltod (Glücksmann, 1951; Saunders, 1966; Paus *et al*, 1993). Der Haarfollikel macht dabei keine Ausnahme (Philpott and Paus, 1998b; Paus *et al*, 1995). Wenige Studien erhellen diese Tatsache. J. Robins (Robins and Breathnach, 1969; Robins and Breathnach, 1969; Robins, 1974 #764]) entdeckte in der humanen Haarfollikelgenese im Zuge ihrer umfangreichen Dissertation "An ultrastructural study of the development of the hair, sebaceous gland, and other structures in human fetal skin" von ihr so genannte dunkle Zellen im Haarfollikelepithel. Die bislang einzige umfassende Arbeit über Apoptose in der Haarfollikelentwicklung wurde von R. Polakowska (Polakowska *et al*, 1994) anhand der humanen Haarfollikelmorphogenese veröffentlicht. Weitere Studien beziehen sich zumeist auf Anagen-( Tamada *et al*, 1994; Soma *et al*, 1998) und Katagenphase (Weedon and Strutton, 1981;

Lindner *et al*, 1997), hier vor allem auf strahlungsinduzierte Apoptose (Potten, 1985; Geng and Potten, 1990), medikamenteninduzierte Apoptose (Goldberg *et al*, 1990; Paus *et al*, 1994b; Lindner *et al*, 1997) oder Apoptose pathologischen Prozessen (Tobin *et al*, 1991; Harada *et al*, 1998).

In dieser Arbeit werden terminale Differenzierung, Apoptose und apoptose-assoziierte Merkmale sowie Proliferation in allen Kompartimenten des Haarfollikels während der gesamten Haarfollikelmorphogenese an einem besonders geeigneten Mausmodell (C57BL/6) mit verschiedenen Methoden untersucht. Weiter schließen die Beobachtungen Telogen und Anagen des Haarzyklus ein, letzteres ist in seinen späteren Stadien der Morphogenese nicht unähnlich. Den Untersuchungen des programmierten Zelltodes im entstehenden und im produzierenden Haarfollikel sind Betrachtungen über den sinnfälligen Anteil der Morphogenese und des Anagens, der Proliferation, gegenübergestellt.

## 2 Fragestellung

Unter Verwendung des C57BL/6- Mausmodells für Haarforschungszwecke sollen unter Einsatz von biochemischen, immunhistologischen und morphometrischen Methoden die folgenden Fragen beantwortet werden:

- Läßt sich ein biochemischer und morphologischer Nachweis führen, daß während der Haarfollikelmorphogenese, des Telogens und der Anagenphase Apoptose *in situ* auftritt?
- Wo genau und in welchen Stadien kommt es innerhalb des Haarfollikels zu Apoptose während der Haarfollikelmorphogenese, des Telogens und der Anagenphase?
- Wie ist die Expression von Markern für abgelaufene Apoptose (TUNEL, Hoechst 33342) korreliert mit der intrafollikulären Expression eines Schlüsselproteins der zellulären Apoptosemaschinerie (ICE, Caspase-1) während der untersuchten Stadien?
- Wie ist die Expression von Markern für abgelaufene Apoptose (TUNEL, Hoechst 33342) und wie die morphometrisch nachgewiesene Proliferation korreliert mit der intrafollikulären Expression des proliferationsassoziierten Markers Ki67 während der untersuchten Stadien?
- Wie ist die Zellkinetik in der Haarfollikelmorphogenese und im Anagen in epithelialen und mesenchymalen Zellen des Haarfollikels
- Welche Hinweise auf allgemeine Grundprinzipien der Proliferation und der Apoptoseregulation im Haarfollikel und epithelialen Zellverbänden *in situ* lassen sich aus den erhobenen Befunden ablesen?
- Sind die erhobenen Ergebnisse vergleichbar mit früheren Untersuchungen am humanen Haarfollikel?

# 3 Materialien, Tiere und Methoden

## 3.1 Materialien und Geräte

Depilation:

- Äther, Hoechst AG, Frankfurt
- 10 %ige Ketaminhydrochlorid-Rompun-Lösung; Ketanest<sup>®</sup>, Parke-Davis, Berlin
- Bienenwachs; Aldrich Chemical Comp. Inc., Milwaukee, USA
- Harz; Sigma Chemie, Deisenhofen
- Metallspatel; Carl Roth GmbH&Co., Karlsruhe
- klinikübliche Einmalinjektionsspritzen, 1 ml; Einmalkanülen 25Gx1"

Hauternte:

- Kleintierscherapparat; Fa. Eickemeyer, Tuttlingen
- Präparierschere; Gr.2, Fa. Aesculap GmbH, Tuttlingen
- Pinzette, anatomisch; Gr.3, Fa. Aesculap GmbH, Tuttlingen
- Einmalskalpelle; Nr. 11, Feather pfm GmbH, Köln
- dünner Karton; aus handelsüblicher Karteikarte zugeschnitten
- handelsübliche Haushaltsaluminiumfolie
- Metallöffel
- Einbettmedium für Gefrierhistologie, OCT, Tissue Tek, Miles
- flüssiger Stickstoff

Gefrierschnitte:

- Kryostat MICROM HM 500 OM, Laborgeräte GmbH, Walldorf
- Glasobjekträger "Super Frost"; Fa. Menzel-Gläser, Ratingen
- Poly-L-Lysine, 1 %-ig; Sigma Chemie, Deisenhofen

Antikörper (AK):

- ICE, polyklonoaler Hase-anti-Maus AK, Verdünnung 1:100 in PBS, Santa Cruz Biotechnologies
- Ki67, polyklonaler Kaninchen-anti-Maus AK, Verdünnung 1:50 in PBS, 1:100 in TBS, Dianova, Hamburg
- Sekundär AK Ziege-anti-Kaninchen, Rhodamin-gekoppelt, Verdünnung 1:200 in PBS
- Sekundär AK Ziege-anti-Kaninchen, Biotin-gekoppelt, Verdünnung 1:200 in TBS

## Färbungen:

- Mausnormalserum
- Ziegennormalserum
- Rindernormalserum
- ABC Kit, Vektor
- Paraformaldehyd, Sigma Chemie, Deisenhofen
- Ethanol, Fa. Merck GmbH, Darmstadt
- Essigsäure, Fa. Merck GmbH, Darmstadt
- TdT-mediated dUTP-digoxigenin nick end labeling, *in-situ*-apoptosis-detection-kit, ApopTag<sup>®</sup>, ONCOR
  - Äquibrilierungspuffer
  - Desoxynucleotidyl-Transferase (TdT)-Lösung
  - Stop-Puffer
  - Anti-Digoxigenin-Fluoreszin-gekoppelte F(ab)<sub>2</sub>-Fragmente
- Phosphat-gepufferte Saline (PBS), für 4l, pH=7,4
  - 32g Natriumchlorid, Sigma Chemie, Deisenhofen
  - 0,8g Kaliumchlorid, Sigma Chemie, Deisenhofen
  - 5,76g Dinatriumhydrogenphosphat, Sigma Chemie, Deisenhofen
  - 0,96g Kaliumdihydrogenphosphat, Sigma Chemie, Deisenhofen
  - auf 4l mit aqua dest. aufgefüllt
- Tris-gepufferte Saline (TBS), 0,05 M, für 1l, pH=7,5
  - 8,78g NaCl, Sigma Chemie, Deisenhofen
  - 0,9g Trisbase, Sigma Chemie, Deisenhofen
  - 6,85g TrisHCl, Sigma Chemie, Deisenhofen
  - auf 1l mit aqua dest. aufgefüllt
- Entwicklerlösung
  - 2-Amino-2-Methyl-1,3-Propanediol; Fa. Merck GmbH, Darmstadt
  - Levamisol; Sigma Chemie, Deisenhofen
  - Neofuchsin-Stammlösung, 5 %-ig in 2 N HCl, Endkonzentration 0,1g/l; Chroma GmbH, Stuttgart;
  - Na-Nitrit; Fa. Merck GmbH, Darmstadt
  - Naphthol-As-Bi-Phosphat; Sigma Chemie, Deisenhofen
  - N,N-Dimethyl-Formamid; Fa. Merck GmbH, Darmstadt
  - N HCl; Fa. Merck, Darmstadt
- Papierfilter, gefaltet; Fa. Schleicher & Schuell, Hamburg

- HOECHST 33342, 2'-[4-Ethoxyphenyl]-5-[4-Methyl-1-Piperazinyl]-2,5'-bi-1h-Benzimidazol, Sigma Chemie, Deisenhofen
- Mayers Häkalaun:
  - 1g Hämatoxilin, Fa. Merck GmbH, Darmstadt
  - 0,2g Natriumjodat, Fa. Merck GmbH, Darmstadt
  - 50g Kalilaun (Aluminiumkaliumsulfat-dodecahydrat), Fa. Merck GmbH, Darmstadt
  - 50g Chloralhydrat, Fa. Merck GmbH, Darmstadt
  - 1g Citrat, Fa. Merck GmbH, Darmstadt
- Kaisers Glyceringelatine, gebrauchsfertig, Fa. Merck, Darmstadt
- Eindeckelmedium VectaShield und Immunomount Fa. Shandon, Pittsburgh, PA für Immunfluoreszenz

#### Diverses:

Färbeküvetten; Deckgläser, Eppendorfgefäße, Wasserbad, Magnetrührer, Zentrifuge, Feinwaage, PVC-Folien 0,2mm, Färbevorrichtung auf der Basis von Kapillarkräften, Saugkissen, Pipetten und Spitzen

#### Auswertung:

- Lichtmikroskop, Zeiss Axioskop; Fa. Carl Zeiss, Oberkochen
- LUMAM-I3 Fluoreszenzmikroskop, LOMO, St. Petersburg, Russland
- Filter:
  - Rhodamin (ICE und Ki67), Anregung 540nm, Emission: 580nm
  - FITC (TUNEL), Anregung 490nm, Emission: 525nm
  - DAPI (HOECHST33342), Anregung 359nm, Emission: 441nm
- Einschub-Vergrößerungslinsen; Fa. Carl Zeiss, Oberkochen
- Bild-Analyse-System (ISIS), Fa. Metasystems, Belmont, MA
- IBM-compatibler Personal Computer

#### Hochauflösende Lichtmikroskopie:

- LKB Ultratome und Glasmesser, Fa. Reichart-Jung Ultracut, Österreich
- Chloroform, Apotheke des Department for Biomedical Sciences, Bradford, Großbritannien
- 1% Toluidinblau in 1% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, filtriert
- Lichtmikroskop, Fa. Leitz, Wetzlar

#### TEM:

- 0,1M Natrium Kakodylat Puffer, Apotheke des Department for Biomedical Sciences, Bradford, Großbritannien
  - 42,8g Dimethylarsinsäure (Kakodylsäure)
  - in 1000ml aqua dest.
  - 5,5ml 0,2N HCl
  - auf pH7
- kakodylat-gepuffertes 1% Osmium Tetroxid, Apotheke des Department for Biomedical Sciences, Bradford, Großbritannien
  - Osmiumtetroxid:
  - 1g OsO<sub>4</sub> in 25ml aqua dest.
  - verdünnen zur 1% Gebrauchslösung mit Kakodylatpuffer
- Karnovsky Medium, Fa. Agar Scientific Ltd. Essex, Großbritannien
- Alkoholreihe, Apotheke des Department for Biomedical Sciences, Bradford, Großbritannien
- Araldite, Fa. Agar Scientific Ltd. Essex, Großbritannien
- LKB Ultratome und Glasmesser, Fa. Reichart-Jung Ultracut, Österreich
- Chloroform, Apotheke des Department for Biomedical Sciences, Bradford, Großbritannien
- 5% Uranylazetat, Apotheke des Department for Biomedical Sciences, Bradford, Großbritannien
- Bleizitrat, Apotheke des Department for Biomedical Sciences, Bradford, Großbritannien
  - 1,33g Bleinitrat
  - 1,76g Natriumcitrat
  - 30ml aqua dest.
  - 8ml 1N NaOH
  - pH12 einstellen
  - auffüllen auf 50ml mit aqua dest.
- Jeol 100x Elektronenmikroskop, Fa. Jeol Tokyo, Japan

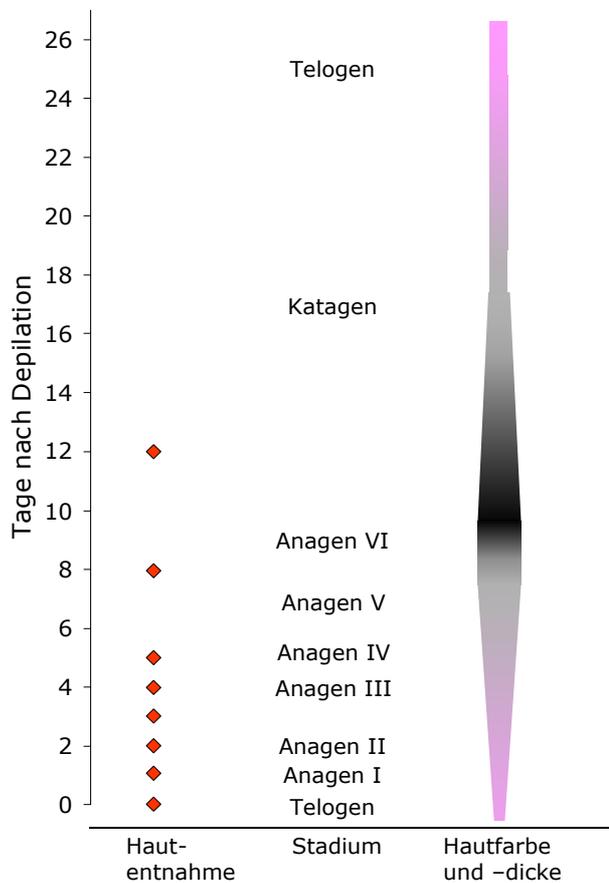
## 3.2 Tiere

Maßgebliche Fortschritte im Verständnis der Biologie des Haarfollikels konnten bislang vor allem am Tiermodell erzielt werden (Chase, 1954; Philpott and Paus, 1998a; Paus and Cotsarelis, 1999). Solange es nicht gelingt, die verschiedenen Zellpopulationen des Haarfollikels, insbesondere die Keratinozyten der Haar-matrix und die Follikelstammzellen zu kultivieren und aus getrennt gezüchteten Zellpopulationen *in vitro* follikelähnliche Organoide zu rekonstituieren, werden *in vivo*-Versuche für absehbare Zeit das wichtigste Instrument auf der Suche nach den Regulationsmechanismen des Haarzyklus bleiben. Seit den Anfängen der Haarbiologie gehört die Maus, deren Haarwachstum mehrere vorteilhafte Besonderheiten aufweist, zu den am besten geeigneten Versuchstieren. Der C57BL/6- Mausstamm ist seit Chase (Chase, 1954) in der Haarforschung etabliert und gut charakterisiert. Der Haarzyklus der C57BL/6-Jungtiere ist hochgradig synchronisiert und mit 18-20 Tagen Dauer gegenüber dem Haar-zyklus des Menschen mit 2-6 Jahren ausgesprochen kurz. Durch Depilation der Haarschäfte können alle Haarfollikel in einem behandelten Hautareal synchron in die Wachstumsphase (Anagen) gezwungen werden und durchlaufen daraufhin alle Wachstumsstadien in definierter Zeit (Paus, 1990).

Verschiedene *in vitro*- Kultivierungstechniken zur Untersuchung der Haarfollikel-entwicklung (Li *et al*, 1992a; Li *et al*, 1992b; Li *et al*, 1992c; Philpott *et al*, 1994) konnten bisher aber die *in vivo*- Modelle nicht ersetzen, da es bis heute nicht gelungen ist, einen vollständigen Haarzyklus *in vitro* ablaufen zu lassen. Sechs bis acht Wochen alte, 15-20 g schwere, syngene, weibliche C57/BL-6 Mäuse wurden von Charles River Laboratories, Hannover bezogen. Die Mäuse wurden in Gemeinschaftsversuchstierkäfigen in Gruppen von maximal fünf Tieren im Versuchstierhaus des Universitätsklinikums Rudolf Virchow, Standort Wedding der Humboldt Universität zu Berlin bei Lichtperioden von zwölf Stunden unter konstanten klimatischen Bedingungen gehalten. Gefüttert wurden die Tiere mit einer Alleindiät für Mäuse und Wasser *ad libitum*. Die Embryonen wurden am 18. und 19. Tag nach Gestation, neonatale Tiere an den Tagen 0,1,2,3,4,5,8,12 post partum und erwachsene Tiere an den Tagen 0,1,2,3,5,8,12 post depilationem geerntet.

Die Haltung der Tiere und die Probenentnahmen wurden tierschutzgerecht nach ordnungsgemäß genehmigten Tierversuchsprotokollen durchgeführt. Ein Gutteil

der Proben entstammte der bereits angelegten Hautbank der Arbeitsgruppe Haarforschung Paus, so daß die Anzahl der ausschließlich für diese Arbeit geopferten Versuchstiere gering gehalten werden konnte.



**Abbildung 3-1, Beziehungen von Hautfarbe und -dicke zum Stadium, Tage der Hautentnahmen**

Da in der Rückenhaut von C57BL/6-Mäusen die pigmentbildenden Melanozyten ausschließlich im Haarfollikel und nicht in der Epidermis lokalisiert sind und diese Melanozyten nur während des Anagen III-VI Melanin produzieren, ist die Hautfarbe dieser Mäuse streng zyklusabhängig. Der Haarzyklus läßt sich makroskopisch verfolgen. Die Haut der C57BL/6-Maus ist im Telogenstadium ihrer Haarfollikel rosafarben. Fünf Tage nach der Induktion beginnt die Haut zu ergrauen und ist am Tag 9 post depilationem schwarz. Zugleich kommt es zu einer Zunahme der Hautdicke, die auch beim spontan eintretenden Anagen zu beobachten ist. Mit dem Übergang in das Katagenstadium und damit dem Sistieren der follikulären Melanogenese zwischen Tag 17 und 19 p.d.

ergraut die Haut erneut, um nachfolgend ins rosafarbene Kolorit des Telogens überzugehen (Chase, 1954; Hansen *et al*, 1984; Paus *et al*, 1989).

## **3.3 Methoden**

### **3.3.1 Gewinnung und Verarbeitung der Hautproben**

#### **3.3.1.1 Haarzyklusinduktion**

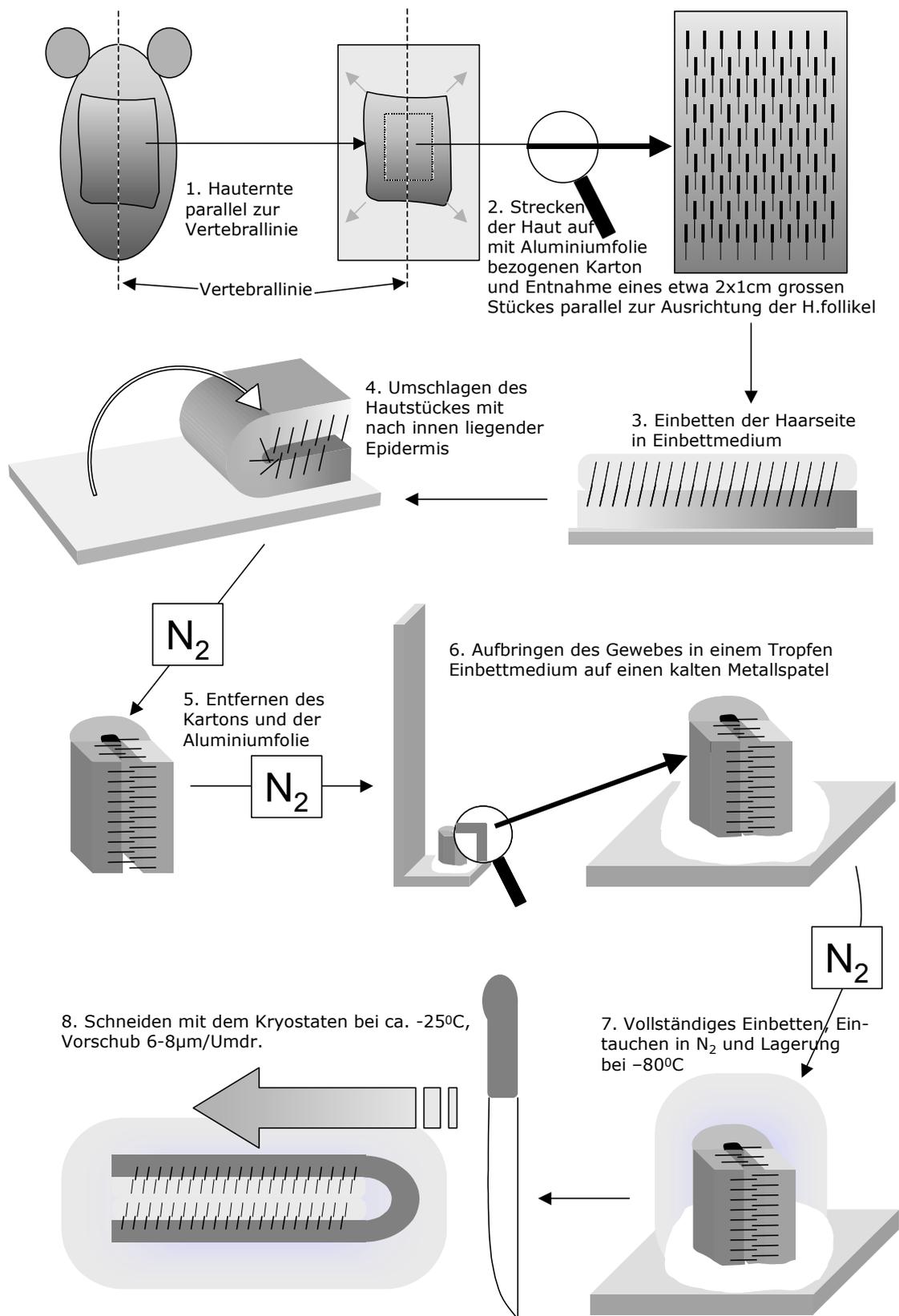
Aktives Haarwachstum (Anagen) in der Rückenhaut von erwachsenen C57BL/6-Mäusen wurde, unter Kurzzeitanästhesie, durch Auftragen einer geschmolzenen Wachs-Harz-Mischung, mittels Depilation induziert (Paus, 1990). Mäuse im Telogenstadium (erkennbar an der Hautfarbe der Tiere) des Haarzyklus wurden mittels einer Äther-Inhalationskurznarkose (Höchst AG, Frankfurt) und anschließender intraperitonealer Injektion von 0,5 ml einer 10% Ketaminhydrochlorid-Rompun-Lösung (Ketanest®) kurzzeitig anästhesiert. Die Ketaminhydrochlorid-Lösung wurde wegen ihrer relativ großen therapeutischen Breite, der sicheren und zugleich einfachen Anwendungstechnik, fehlender atemdepressorischer Wirkung und nur sehr selten auftretenden allergischen Reaktionen gewählt (Dudziak, 1980).

Zur Depilation wurden Bienenwachs (Aldrich Chemical Comp. Inc., Milwaukee, USA) und Harz (Sigma-Chemie, Deisenhofen) zu gleichen Gewichtsanteilen gemischt und durch Erhitzen auf 40<sup>0</sup>-45<sup>0</sup> C geschmolzen. Auf einem erwärmten Metallspatel (Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe) wurde die Masse an der Luft soweit abgekühlt, daß sie gerade noch streichfähig war und von kranial nach kaudal gleichmäßig dünn auf die Rückenhaut der Tiere aufgetragen. Nach circa zwei Minuten wurde die dann erkaltete und gehärtete Wachs-Harz-Mischung mit den darin festhaftenden, fixierten Haarschäften manuell entfernt. Diese Behandlung, die bei korrekter Anwendung keine sichtbare Entzündungsreaktion zur Folge hat, induziert den Beginn eines neuen Haarzyklus (Chase, 1954; Paus *et al*, 1990; Paus und Czarnetzki, 1992).

#### **3.3.1.2 Gewebeentnahme**

Vor der Gewebeentnahme erhielten die Mäuse eine Äther-Inhalationsanästhesie und wurden dann an definierten Tagen der Morphogenese oder des depilations-induzierten Haarzyklus getötet. Mit einem Kleintierscherapparat wurden störende Haarschäfte entfernt, soweit sie schon nachgewachsen waren. In Höhe des Schwanzansatzes wurde die Haut mittels eines Skalpells perforiert und dann mit

einer Präparierschere zunächst großflächig stumpf von der darunter liegenden Körperfaszie disseziert. Die so mobilisierte Rückenhaul wurde durch scharfen Scherenschnitt von der Maus abgetrennt und zunächst auf kartonierter Alufolie aufgespannt. Entlang der Vertebrallinie wurde dann ein ca. 1,5 x 3 cm großes, rechteckiges Hautareal aus der zentralen Rückenregion mit einem Skalpell (Nr. 11, Feather pfm GmbH, Köln) entnommen (siehe Abbildung 3-2).



**Abbildung 3-2, Technik der Hautentnahme und -bearbeitung**

### **3.3.1.3 Gewebeverarbeitung für die immunhistochemische Verwendung**

Die Hautentnahme und -verarbeitung erfolgte nach einer von Hofmann entwickelten Methode (Paus *et al*, 1994a), die neben einer standardisierten und schonenden Probenverarbeitung auch die Gewähr bietet, beim späteren Schneiden der Gewebestücke eine große Anzahl von Haarfollikeln in der gewünschten longitudinalen Richtung zu treffen (siehe Abbildung 3-2, Technik der Hautentnahme und -bearbeitung ).

Das wie oben beschrieben entnommene Hautstück wurde auf einem kalten Aluminiumspatel mit ebener Fläche plaziert, so daß das Gewebe gefaltet (mit einer dünnen Schicht blasenfreien Einbettmediums zwischen den beiden Lagen) werden konnte und mit seinen Innenseiten aufeinander zu liegen kam. Das so erhaltene gedoppelte Hautstück wurde in flüssigem Stickstoff kurz angefroren und danach hochkant in einen Tropfen angefrorenen Einbettmediums gestellt, so daß die gefaltete Längsseite des Gewebes nach oben zeigte, mit Einbettmedium ganz umhüllt und erneut bis zur vollständigen Durchfrierung des Gewebes in flüssigen Stickstoff getaucht. Die Lagerung der Hautproben bis zur Weiterverarbeitung erfolgte bei  $-80^{\circ}\text{C}$ . Die gesamte Prozedur wurde so rasch und so schonend wie möglich durchgeführt, um die Gefahr postmortaler Gewebeveränderungen so gering wie möglich zu halten.

Ebenso wurde mit graviden Tieren verfahren, deren - nach Tötung des Muttertieres - entfernte Embryos nochmals mit Äther narkotisiert wurden. Sie wurden danach getötet und in toto in Einbettmedium eingefroren.

### **3.3.1.4 Gewebeverarbeitung für die hochauflösende Lichtmikroskopie und die Transmissionselektronenmikroskopie**

Die Hauternte erfolgte wie unter 3.3.1.2 beschrieben. Unverzüglich nach der Entnahme wurden aus der Haut vorsichtig kleine Würfel von höchstens 1mm Kantenlänge geschnitten, sofort in Karnovskys Medium fixiert und mit 0,1 M Natrium-Kakodylat-Puffer auf pH 7,4 gepuffert. Die Hautstückchen wurden für 1 Stunde in kakodylat-gepuffertem 1% Osmiumtetroxid nachfixiert und in einer

aufsteigenden Alkoholreihe (je 15min) dehydriert. Die entwässerten Proben wurden anschließend in einer aufsteigenden Propylenoxid-Kunstharz-Reihe (1:1 20min, 1:3 20min, reines Harz 8h) unter ständiger Bewegung der Probengefäße durchtränkt, in einer Gummiform ausgerichtet und darin in Taab 812 -Kunstharz eingebettet. Die Härtung erfolgte bei 60°C innerhalb von 48h.

### **3.3.1.5 Herstellung der Kryostatschnitte**

An einem Kryostaten (MICROM HM 500 OM, Laborgeräte GmbH, Walldorf) wurden bei einer Verarbeitungstemperatur von etwa -20° bis -30°C aus den Proben 6-8µm dicke Gewebsschnitte angefertigt. Der Winkel des Probenblockes zum Messer wurde so gewählt, daß mindestens auf einer Seite des gefalteten Hautstückes die Mehrzahl der Haarfollikel longitudinal getroffen war. Die in der Histologie gebräuchlichen Glasobjektträger wurden vor der Verwendung mit Poly-L-Lysine beschichtet. Nach Lufttrocknung der Schnitte über mehrere Stunden bei Raumtemperatur, Acetonfixierung (10 min bei -20°C) und erneuter Lufttrocknung erfolgte die Lagerung bis zur Durchführung der Färbungen bei -20°C. Die Schnitte, die mit der TUNEL-Methode gefärbt werden sollten, wurden nach etwa 10 Minuten Trocknung sofort weiterverarbeitet.

### **3.3.1.6 Herstellung der Semi- und Ultradünnschnitte**

Nach der Aushärtung der Harzblöcke wurden sie mit einer Rasierklinge getrimmt. Mit frisch gebrochenen Glasmessern wurde der Block zunächst auf einem LKB Ultratome (Fa. Reichart-Jung Ultracut, Österreich) unter dem Stereomikroskop feingetrimmt, angeschnitten und grob die Schnittebene ausgerichtet. Danach wurden mit wieder frisch gebrochenen Messern, auf denen mit Wachs der mit aqua dest. gefüllte Trog befestigt war, die ersten Semidünnschnitte geschnitten. Dabei betrug der Vorschub zwischen 400-800nm. Sie wurden im Wasser liegend mit Chloroform bedampft, mit einer Öse herausgenommen und auf Objektträger verbracht. Nach dem Trocknen bei 60°C wurden die Schnitte bei der selben Temperatur mit Toluidinblau für 30-60s gefärbt, gewaschen und unter dem Lichtmikroskop beurteilt. Mußte die Schnittebene bei Bedarf noch leicht verändert werden, wurden zunächst erneut Semidünnschnitte hergestellt. Bei zufriedenstellender Ebeneneinstellung begann mit wieder sorgfältig frisch gebrochenen Messern das Schneiden der Ultradünnschnitte (80-90nm). Sie

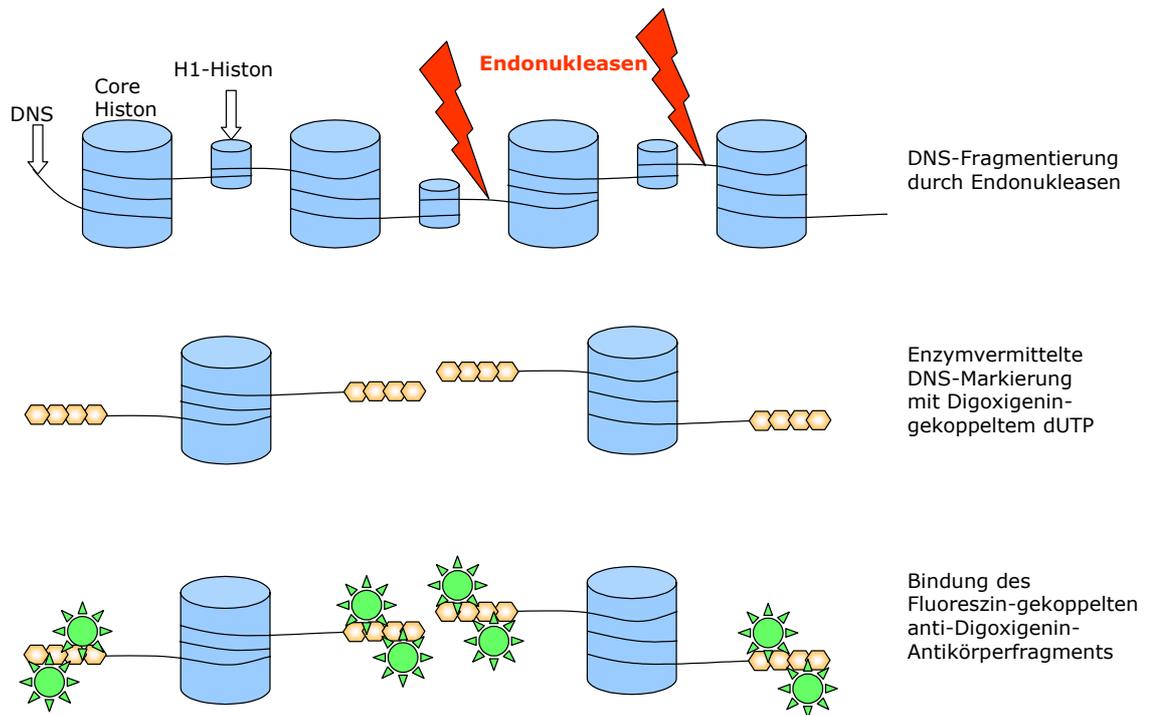
wurden, wiesen sie die entsprechende silbern-goldene-Interferenzfärbung auf, mit Chloroform gestreckt und unter zurhilfenahme einer Wimper auf die mit Aceton benetzten Kupfergrids gehoben.

### **3.3.2 TUNEL-Färbung und Immunhistologie**

#### **3.3.2.1 TUNEL in-situ Endmarkierung**

Zur Markierung fragmentierter DNS, ein Charakteristikum apoptotischer Zellen, wurde die terminale Desoxynukleotid-Transferase vermittelte dUTP- fluoreszeingekoppelte DNS Fragmentmarkierung (**T**dT-mediated d**U**TP-digoxigenin **n**ick **e**nd labeling, ApopTag®, Oncor) verwandt. Bei dieser Technik werden Einzelstrangbrüche in der genomischen DNA nachgewiesen, die durch aktivierte Endonukleasen bei Apoptose zwischen den Histonen entstehen (siehe Abbildung 3-3). Die Markierung der Bruchstellen erfolgt durch den Einbau von modifizierten Nucleotiden mit Terminaler Desoxyribosyl-Transferase. Die Zellen werden dafür zunächst mit Paraformaldehyd fixiert, die Cytoplasmamembran wird dadurch permeabilisiert. Auf die fixierten Zellen gibt man nun eine Lösung aus Terminaler Desoxyribosyl-Transferase und digoxigeninmarkierten Nucleotiden. Das Enzym koppelt die markierten Nucleotidderivate an die freien 3'OH-Enden von DNA-Strangbrüchen. Der Nachweis der eingebauten modifizierten Nucleotide erfolgt nach Markierung mit fluoreszeingekoppelten Antidigoxigenin-Antikörperfragmenten (Fluorescein-isothiocyanate (FITC)-konjugierten F(ab)<sub>2</sub>) unter dem Fluoreszenzmikroskop.

Die Gegenfärbung wurde mit nicht-interkalierendem Hoechst 33342 (2'-[4-ethoxyphenyl]-5-[4-methyl-1-piperazinyl]-2,5'-bi-1h-benzimidazole, Sigma Chemical Co, Diesenhofen, Germany) (Sailer *et al*, 1997), einem DNA-bindendem Fluorochrom mit bevorzugter Bindung an A-T Basenpaare (Crissman und Steinkamp, 1993) ausgeführt. Da es erhöhte Leuchtdichte in apoptotisch geschrumpften Zellkernen und apoptotischen Körperchen (apoptotic bodies) erzeugt (Schilli *et al*, 1998), dient es als Gegenfärbung und gleichzeitig als Kontrolle der TUNEL-positiven Markierungen (Hardin *et al*, 1992; Lindner *et al*, 1997).



**Abbildung 3-3, Mechanismus der TUNEL-Färbung**

Die Sensitivität dieser Methode ist sehr hoch: Im Prinzip kann damit jede einzelne apoptotische Zelle identifiziert werden und das bereits in einer sehr frühen Phase der Apoptose. Die Spezifität allerdings ist, durch die Markierung auch solcher Zellen, die nekrotische DNS-Degradation aufweisen, geringer. Die Überprüfung der Ergebnisse mit anderen Methoden wird von manchen Autoren empfohlen (Negoescu *et al*, 1996; Labat Moleur *et al*, 1998).

Auf die gelelektrophoretische Darstellung der DNS-Leiter, die bis vor kurzem als Standardnachweis für apoptotische Zellen galt (Wyllie *et al*, 1980; Oberhammer *et al*, 1993), wurde hier wegen einer großen Zahl von methodischen Problemen und falsch-positiven wie falsch-negativen Ergebnissen verzichtet. So ist es äußerst schwierig, die Endonukleaseaktivität in einem intakten Organ nachzuweisen, in dem für gewöhnlich nur ein sehr kleiner Teil von Zellen zu einem bestimmten Zeitpunkt Apoptose durchläuft, so daß auch bei optimalen Bedingungen nur schwache Banden in Nukleosomengröße erwartet werden können (Cotter und Martin, 1996). So zeigte sich bei Linder (Lindner *et al*, 1997) eine sehr schwache DNA- Fragmentierung bei Maushautextrakten vom Tag 12 p.d., erst im Katagen wurden die Ergebnisse signifikant. Darüberhinaus erlaubt

der Nachweis der DNS-Leiter keine Rückschlüsse auf die Lokalisation der apoptotischen Zellen.

### **3.3.2.2 Doppelfärbung TUNEL-ICE und TUNEL-Ki67**

Um zum einen beurteilen zu können, welche Zellpopulationen im Haarfollikel ICE-Immunreaktivität (IR) und gleichzeitig Zeichen von DNA-Fragmentierung zeigen, und zum anderen einen räumlichen Zusammenhang zwischen Apoptose und Proliferation aufzuzeigen, wurde die kombinierte Hoechst 33342 und TUNEL-Methode mit einer immunohistochemischen Färbemethode zu einer Dreifach-Markierung kombiniert.

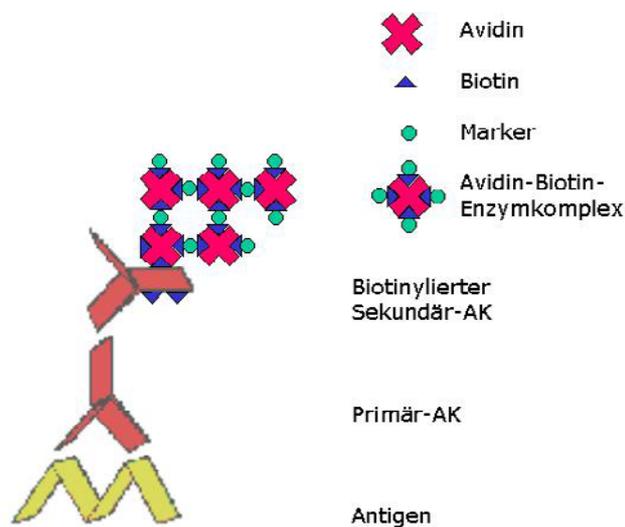
Dafür wurden Kryostat-Gewebeschnitte (6-8µm) der Rückenvollhaut frisch geschnitten und zunächst in 10% Formalin für 10min bei RT und anschließend in Ethanol/Essigsäure (2:1) für 5min bei -20°C fixiert. Die Schnitte wurden dann kurz mit dem Äquilibrierungspuffer für 5min bei RT bedeckt. Nach der Inkubation mit Terminaler Desoxyribosyl-Transferase und dem Unterbrechen der enzymvermittelten Reaktion wurden unspezifische Bindungsstellen mit 10% Ziegennormalserum (ZNS) geblockt und dann der in PBS gelöste Primärantikörper 1% aufgetragen. Dieser war entweder gegen das Ki67 AG oder gegen das ICE-AG gerichtet. Als Negativkontrolle dieser AK wurde anstatt des Primärantikörpers nur mit Medium inkubiert oder mit Kaninchen- oder Ratten-IgG. Negative Kontrollen der TUNEL-Färbung wurden, wie im Protokoll des Herstellers beschrieben, durch Weglassen der TdT durchgeführt. Als Positivkontrollen wurden Schnitte durch embryonales Mausgewebe verwendet (siehe Abbildung 1-12). Nach der Übernachtinkubation bei 4°C wurde zunächst mit dem Auftragen der Anti-Digoxigenin-Fluoreszein-gekoppelten F(ab)<sub>2</sub> Fragmente die TUNEL-Färbung beendet, danach der immunohistochemische Teil mit der Inkubation mit rhodaminiertem Sekundär-AK. Abschließend erfolgte die Gegenfärbung mit Hoechst 33342. Tabelle 3-1 zeigt das genaue Schritt-für-Schritt-Protokoll dieser Färbung.

**Tabelle 3-1, TUNEL / Ki67 Doppelfärbung**

	T in °C	t in min
Schockgefrorenes Gewebe frisch schneiden, ca. 10 min trocknen lassen, mit Fettstift umranden		
Fixieren in 10% Formalin (im Abzug) → PBS (immer 3x5 min)	RT	10'
Postfixieren in Ethanol/Essigsäure 2:1 → PBS waschen	- 20	10'
Äquilibriumspuffer 13 µl / Schnitt unter Folie, dann Folie entfernen	RT	5'
TdT Lösung 10 µl / Schnitt unter Folie, bestehend aus: 7,04 µl Reaktionspuffer 2,96 µl Terminale Desoxyribosyl-Transferase dann Folie entfernen	37	60'
Stoppuffer → PBS waschen	37	30'
Blocken mit ZNS 70 µl / Schnitt 10% ZNS in PBS	RT	20'
<b>Entweder:</b> 1. AK KI67 (polyklonal Hase anti Maus, Dianova, Hamburg) <b>oder:</b> AK ICE (polyklonal Hase anti Maus ICE p10, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)  70 µl / Schnitt 1% AK in PBS	4 °C	über Nacht in Inkub.-kammer
→ PBS waschen		
AK-Lösung TUNEL 13µl / Schnitt unter Folie, bestehend aus: 6,33µl Blocklösung 6,76µl Anti-Digoxigenin-Fluoreszein-gekoppelte F(ab) <sub>2</sub> Fragmente dann Folie entfernen → PBS waschen	RT	30'
2. AK Ziege anti Hase rhodaminiert 70 µl / Schnitt 0,5% AK 4% MNS 2% ZNS in PBS → PBS waschen	RT	30'
Kernfärbelösung Hoechst 33342 70 µl / Schnitt 1:400 in PBS oder 1:200 in PBS → PBS waschen	RT	40' 15'
Eindeckeln mit VectaShield o.ä.		

### 3.3.2.3 Avidin-Biotin-Komplex-Methode

Das Antigen wird vom Primärantikörper detektiert, an den der mit Biotin markierte Sekundärantikörper angreift. Das Biotin-Molekül hat eine hohe Affinität zu Avidin, das in einer Zubereitung als Avidin-Biotin-Komplex (ABC) mit Peroxidase konjugiert (ABC-PO) ist. Durch die Bindung von auf das Gewebe gegebenen ABC-PO an das Biotin des Sekundärantikörpers ist das Enzym am Ort des vom Primärantikörper detektierten Antigens, welches jetzt bei Substratangebot durch eine Farbstoffreaktion sichtbar gemacht werden kann. Wegen der höheren Sensitivität der ABC-Methode gegenüber der Immunfluoreszenz wurde die Färbung des Ki-67 Antigens zusätzlich mit dieser Methode ausgeführt.



#### Abbildung 3-4, molekularer Mechanismus der ABC-Methode

Zur Detektion und Visualisierung des Antigens Ki67 wurden die Kryostatschnitte eine Stunde bei Raumtemperatur (RT) luftgetrocknet, in 0,1 M Tris gepufferter Salzlösung (TBS) mit einem pH-Wert von 7,4 für 15min bei RT gewaschen und mit Avidin- und Biotin-Blockierungs-Lösung für je 15min behandelt (zwischen den Schritten spülen mit TBS). Dann wurden sie mit 10% ZNS zur Blockierung unspezifischer Bindungen inkubiert. Ohne Waschen folgte dann die Inkubation mit dem Primärantikörper Ki67 (polyklonal Hase anti Maus, Dianova, Hamburg) in TBS (1:100) über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurden die Schnitte mehrfach gespült und mit dem biotinylierten Sekundärantikörper Ziege-anti-Hase (1:200 in TBS), 4% Mausnormalserum und 2% ZNS bei Raumtemperatur

inkubiert, danach wieder gespült und mit ABC-PO für 30min inkubiert. Nach erneutem Spülen erfolgte die Entwicklung der braunen Farbreaktion mit DAB, bis sie nach Augenschein durch Spülen abgebrochen wurde. Nach letztem sorgfältigem Waschen erfolgte die Gegenfärbung in Mayers Hämalaun und das Eindeckeln der Schnitte mit Kaisers Glyceringelantine. Diese Färbung wurde mit der in 3.3.2.4 beschriebenen Einspannvorrichtung für Objektträger vorgenommen. Tabelle 3-2 zeigt das genaue Schritt-für-Schritt-Protokoll dieser Färbung.

**Tabelle 3-2, Färbeprotokoll der Ki67 Färbung**

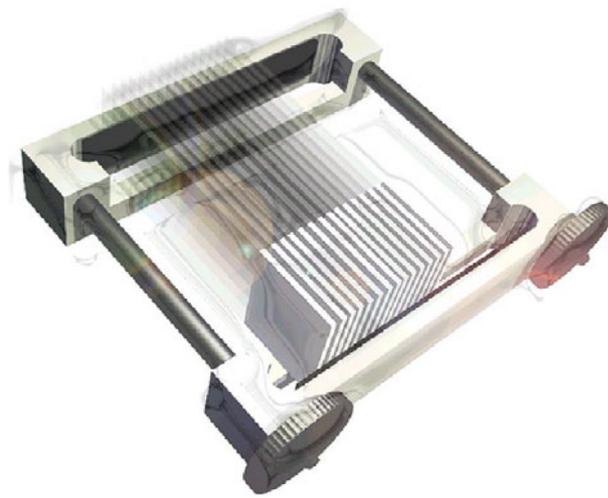
Acetonfixierte Kryostatschnitte werden in die Einspannvorrichtung für Objektträger eingelegt und sorgfältig gespült	RT	
Absaugen der Spülflüssigkeit		
Füllen der Spalte mit Avidin-Blockierungslösung	RT	15'
Spülen und Absaugen der Spülflüssigkeit		
Füllen der Spalte mit Biotin-Blockierungslösung	RT	15'
Spülen und Absaugen der Spülflüssigkeit		
Füllen der Spalte mit 10% ZNS in TBS	RT	20'
Füllen der Spalte mit 1. AK Ki67 (polyklonal Hase anti Maus, Dianova, Hamburg) 1:100AK in TBS	4 °C	über Nacht
Spülen und Absaugen der Spülflüssigkeit		
Füllen der Spalte mit 2. AK Ziege-anti-Hase biotinyliert 1:200 AK 4% MNS 2% ZNS in TBS	RT	30'
Spülen und Absaugen der Spülflüssigkeit		
Füllen der Spalte mit Avidin-Biotin-Komplex (ABC) peroxidasekonjugiert	RT	30'
Spülen und Absaugen der Spülflüssigkeit		
Entwicklung der Farbreaktion mit DAB	RT	nach Augenschein
Spülen und Absaugen der Spülflüssigkeit		
Herausnehmen der Objektträger aus der Einspannvorrichtung und Gegenfärbung in Mayers Hämalaun	RT	nach Augenschein
Eindeckeln der Schnitte mit Kaisers Glyceringelantine		

#### **3.3.2.4 Einspannvorrichtung für Objektträger**

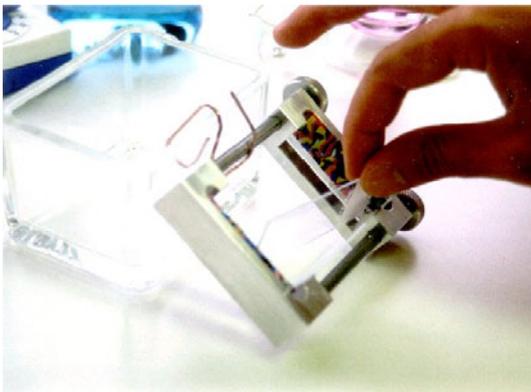
Zur Effektivierung des aufwendigen immunhistochemischen Procedere wurde ein kleiner Halteapparat für Objektträger (Abbildung 3-5) entwickelt. Die Einfachfärbungen Ki67 wurde mit dieser Vorrichtung vorgenommen. Die Objektträger sind dabei paarweise angeordnet und durch PVC-Folienstücke getrennt, die so kapillare Spalte erzeugen. Durch diese erfolgt die Benetzung mit der gewünschten Antikörperverdünnung, dem Waschpuffer oder der Färbelösung.

Sie wurde am 20.05.1999 beim Deutschen Patent und Markenamt unter der Bezeichnung "Einspannvorrichtung für Objektträger zum immunhistochemischen Anfärben von Gefrier- und Paraffinschnitten mittels Kapillarkraft", Nr. 299 03 171.3 als Gebrauchsmuster eingetragen.

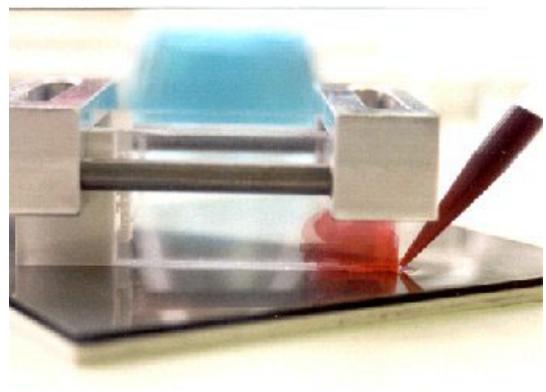
Ein kleines, den Maßen der hier verwendeten handelsüblichen Objektträgern angepaßtes Gestell ermöglicht es, die Objektträger zwischen zwei moosgummi-beschichteten Winkeln waagrecht stehend anzuordnen (Abbildung 3-5). Zum Bestücken der Einrichtung wird es umgedreht, so daß die offenen Winkel dem Betrachter entgegenstehen, die dem Betrachter entferntere Seite wird leicht angehoben. Der erste Objektträger wird mit der gewebebeschichteten Seite nach oben eingelegt (Abbildung 3-6). Dann wird seitlich je eine kleine, zuvor befeuchtete Folie aufgebracht, auf der bedruckten Seite des Objektträger die größere, gegenüber die kleinere. Darauf legt man mit der gewebebeschichteten Seite nach unten den nächsten Schnitt. Damit entsteht der erste kapillare Spalt. Der nächste Objektträger wird wie der erste aufgelegt, ohne Abstandshalter, direkt auf den zweiten, die beschichtete Seite wieder nach oben. Auch er wird an den Seiten mit PVC-Folie versehen, die den Abstand zum nächsten Objektträger erzeugt, der wieder mit der beschichteten Seite nach unten zeigt.



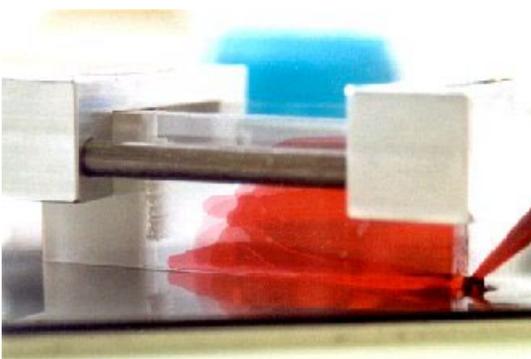
**Abbildung 3-5, Vorrichtung zum Anfärben von Gewebeschnitten mittels Kapillarkraft**



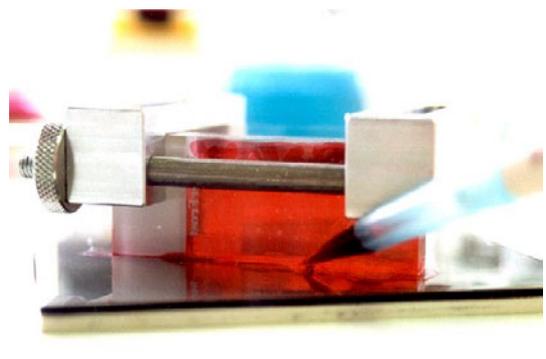
**Abbildung 3-6, Befüllen der Vorrichtung**



**Abbildung 3-7, Inkubation durch seitliches Pipettieren**



**Abbildung 3-8, Füllung der Spalte, hier beispielhaft mit Hämalaun**



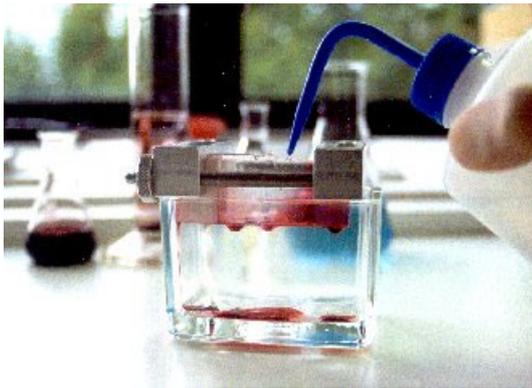
**Abbildung 3-9, Kapillarkräfte führen zu gleichmäßiger Benetzung der Schnitte**

Der Abstand der den Kapillareffekt erzeugenden Gläser hängt damit von den Folien ab, die zwischen den paarweise angeordneten Objektträger angebracht werden. Als praktikabel erwies sich eine Folienstärke um die 140-200µm. Eine weiche Beschaffenheit und Maßtreue der Folie ist wünschenswert, da so der tote Raum, v.a. der serienmäßig bedruckte des Objektträger nicht inkubiert wird. Wenn Objektträger in der gleichen Prozedur mit verschiedenen Antikörpern inkubiert werden sollen, werden die verschiedenen Objektträger-Paare nicht aufeinandergelegt, sondern räumlich getrennt. Gleiches geschieht mit den Negativkontrollen. Auf diese Weise lassen sich gleichzeitig etwa:  
32 Objektträger, 1 Antikörper, 2 Objektträger Negativkontrolle  
je 14 Objektträger, 2 Antikörper, 2 Objektträger Negativkontrolle  
färben.

Nach dem Einlegen der Gläser und der Folien werden die Spannrandelräder sanft angezogen. Das Moosgummi in den Winkeln verhindert eine Absplitterung der Objektträger und gewährleistet einen gleichmäßigen Druck auf die Objektträger. Nun kann man die Vorrichtung samt den eingespannten Objektträger umdrehen, stellt sie auf eine mit PVC-beschichtete Moosgummiplatte (Abbildung 3-7), auf deren Oberfläche die gewünschten Areale zur Inkubation mit Fettstift eingezeichnet sind. Dies ist nur nötig, wenn mit mehreren Antikörper gearbeitet wird. Wenn nun die beladene Spannvorrichtung auf der Inkubationsfolie steht, die Objektträger gleichen nun einem Glasblock, pipettiert man 200-300 µl pro Objektträger-Paar an die Seite des Blocks, an dem das kleinere PVC-Stück den Abstand hält. Die an die Seite pipettierte Flüssigkeit zieht sich schnell in die kapillare Spalte (Abbildung 3-8), füllt über 2/3 der verfügbaren Fläche. Luftblasen sind selten. Sanftes Klopfen auf das Gestell führt zu vollständiger Füllung der kapillaren Spalte (Abbildung 3-9). Auf diese Weise werden die Objektträger gleichzeitig und gleichmäßig inkubiert. Ebenso werden alle Schnitte gleichmäßig gewaschen, indem man die Apparatur frei aufhängt. Jeder oben zugefügte Tropfen Waschpuffer durchläuft die kapillaren Spalte und tropft an der Unterkante wieder heraus (Abbildung 3-10), dabei ist jeder Schnitt ständig vollständig von Puffer umgeben, was das Austrocknen verhindert (Abbildung 3-11).

Eine komplett neue Füllung des Spaltes ohne Konzentrationsverluste durch hängengebliebene Pufferreste erreicht man durch vorheriges Absaugen (Abbildung 3-12). Dazu benutzt man eine saugfähige Unterlage, wie z. B. einen

Schwamm oder Zellstoff. Durch Senkrechtstellen und vorsichtiges Bewegen den Vorrichtung bei gleichzeitigem Druck auf die Saugfläche entleeren sich die Spalte schnell und vollständig. Danach kann man erneut alle Spalte durch seitliches Pipettieren füllen. Für Übernachtinkubationen wurde eine handelsübliche Plastikdose verwendet (Abbildung 3-13).



**Abbildung 3-10, Ausspülen der inkubierten Lösung**



**Abbildung 3-11, Gewaschene Schnitte**



**Abbildung 3-12, Absaugen auf saugfähiger Unterlage**



**Abbildung 3-13, Luftdichte Inkubationskammer**

### **3.3.3 Transmissionselektronenmikroskopie und hochauflösende Lichtmikroskopie**

#### **3.3.3.1 Semidünnschnitte und hochauflösende Lichtmikroskopie**

Die Herstellung und die Färbung der Semidünnschnitte wurde in Kapitel 3.3.1.6 beschrieben. Die Auswertung der Schnitte erfolgte unter dem Lichtmikroskop (Fa. Leitz, Wetzlar) bei einer 100-fachen Vergrößerung unter dem Immersionsölobjektiv. Die Bildaufnahmen entstanden mit einer zum Mikroskop gehörigen Spiegelreflexkamera, die Entwicklung der Negative und die Herstellung der Abzüge der 35mm Filme wurde von einem ortsansässigen Unternehmen vorgenommen.

#### **3.3.3.2 Ultradünnschnitte und Transmissionselektronenmikroskopie**

Die Herstellung der Ultradünnschnitte wurde in Kapitel 3.3.1.6 beschrieben. Nach dem Aufziehen auf die Grids wurden die Schnitte kontrastiert. Die in Petrischalen mit der Probenseite nach oben gelegten Grids wurden mit einem Tropfen 5% Uranylazetat bedeckt. Nach einer Viertelstunde wurde der Überstand mit Filterpapier abgesaugt, NaOH-Plätzchen in die Petrischale gegeben und die Schnitte für 20min mit Bleizitrat benetzt. Danach wurden die Schnitte mehrfach in aqua dest. gewaschen und getrocknet. Die Auswertung der Ultradünnschnitte erfolgte unter dem Jeol 100x Elektronenmikroskop (Fa. Jeol Tokyo, Japan) bei 80kV und verschiedenen Vergrößerungen. Die Bildaufnahmen entstanden ebenfalls mit diesem Mikroskop, die Entwicklung der Negative und die Herstellung der Abzüge wurde in der Dunkelkammer der Universität Bradford, England mit handelsüblichen Entwickler- und Fixierungslösungen vorgenommen.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Apoptoseassoziierte Marker (TUNEL-Positivität und ICE Immunreaktion) in der Haarfollikelmorphogenese

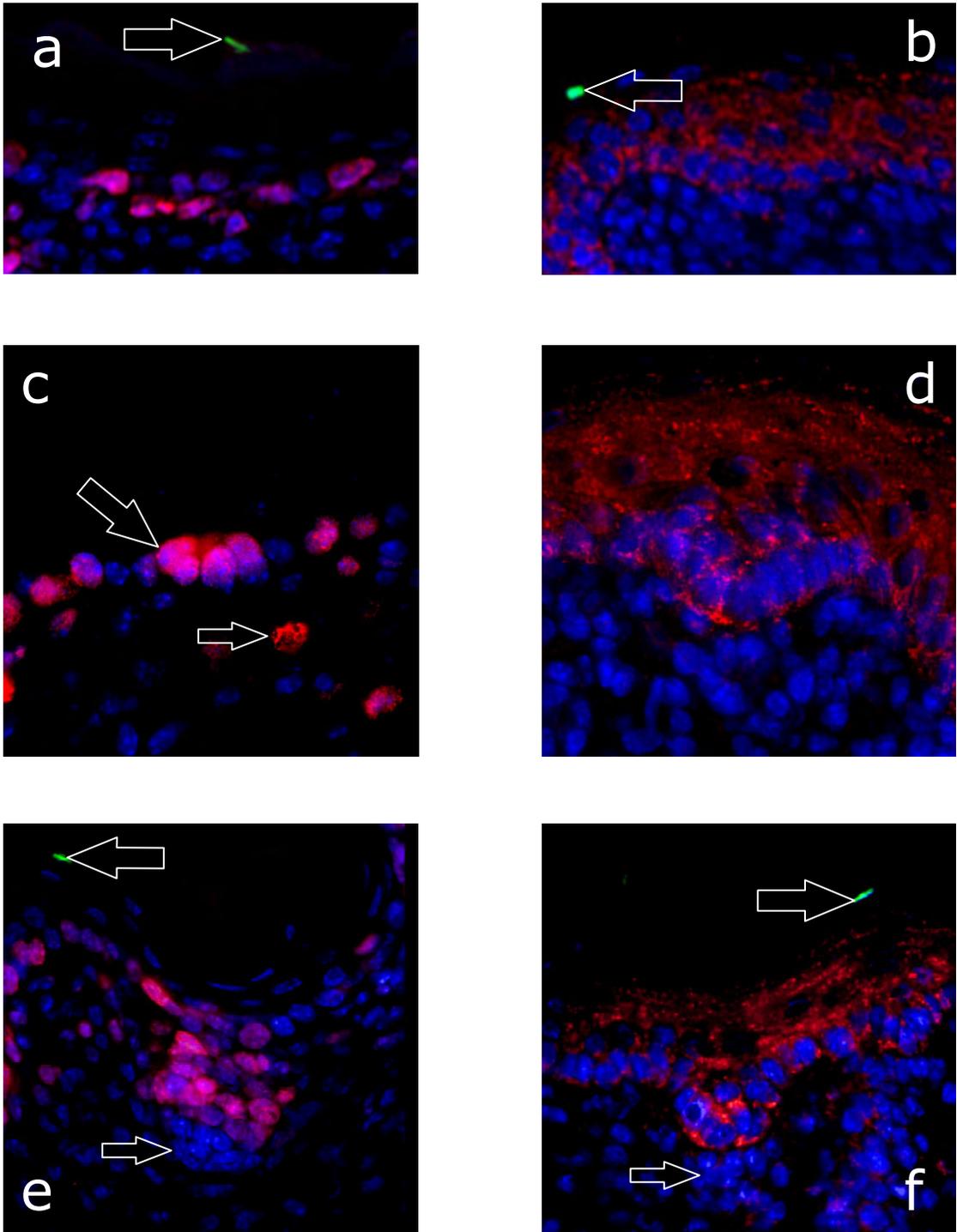
Apoptose in der Organogenese ist ein regelhaftes Phänomen (Glücksmann, 1951; Saunders, 1966; Kerr *et al*, 1972; Mori *et al*, 1995; Milligan und Schwartz, 1997). Mit einem massiven Vorkommen von Apoptose hat dies nicht zu tun, wie beispielsweise die HF-Regression durch Apoptose im Katagen (Lindner *et al*, 1997). Ist im folgenden von einer "hohen Dichte apoptotischer Zellen" die Rede, muss man dies im rechten Verhältnis sehen. Die Doppelfärbung mit der TUNEL-Methode und dem HOECHST 33342-Farbstoff zeigte, daß annähernd alle TUNEL-positiven Zellen auch eine starke Intensität an HOECHST 33342-Farbstoff (verglichen zu benachbarten TUNEL-negativen Zellen) aufwiesen (Whiteside *et al*, 1998; Schilli *et al*, 1998). Aus diesem Grund werden TUNEL- und HOECHST 33342 positive Zellen im folgenden Text vereinfacht mit "TUNEL+" bezeichnet. Der besseren Lesbarkeit wegen wird für die Caspase-1 der ältere Begriff ICE verwendet.

Die Ergebnisse zeigen, daß die Relation von TUNEL+ Zellen und ICE keine unmittelbare ist. Dabei ist zu berücksichtigen, daß sich der verwendete ICE Antikörper sowohl gegen die aktive als auch die inaktive Form richtet (Shimizu *et al*, 1996; Bhat *et al*, 1996). So wurde in stark ICE+ Zellverbänden nicht zwangsläufig auch eine hohe Dichte an TUNEL+ Zellen gefunden. Jedoch zeigte sich, daß in Regionen, die durch die gesamte HF-Entwicklung keine ICE IR aufwiesen, auch keine Zellen apoptosierten (z.B. die Zellen der DP).

In den frühen Stadien (0-3) der HF Morphogenese (MG) weist die Epidermis im Stratum basale, Stratum spinosum und im Stratum granulosum eine starke ICE IR auf (Abbildung 4-1 b, d, f; Abbildung 4-2 b), während die Dermis ICE- ist. TUNEL+ Zellen finden sich in allen Schichten der Epidermis, so im Stratum spinosum (Abbildung 4-1 b) und im tiefen Stratum corneum (Abbildung 4-1 a, e, f). Die letzteren sind flache, längliche TUNEL+ Zellen, die parallel zur

Hautoberfläche liegen. TUNEL+ Zellen in den darunterliegenden Epidermiszellschichten sind meist rund.

In diesen frühen Stadien sind alle Keratinozyten des sich entwickelnden Haarkeimes stark ICE+. Die IR ist auf den epithelialen Anteil des Haarkeimes begrenzt und schließt zur Dermis scharf ab (Abbildung 4-1 b, d, f; Abbildung 4-2 b). So sind die dermalen Fibroblasten, die in diesen Stadien zur DP aggregieren, durchweg ohne ICE IR. Mit der räumlichen Organisation der Zellen, die die einzelnen Schichten des HF bilden werden (Stadium 4), also der Bildung des Haarkonus, der in diesem Stadium eher als IWS-Konus zu bezeichnen ist, geht die ICE IR aus dem gesamten Bulbusbereich zurück (Abbildung 4-2 d). In den weiteren Stadien bleibt der Bulbus frei von ICE+ Zellen. Im Stadium 5 erscheinen die ersten TUNEL+ Zellen im Follikelepithel (Abbildung 4-2 e, f). Diese Zellen sitzen regelmäßig dem Haarkonus auf, sie sind im Stadium 5 noch oval oder tropfenförmig, wenn der Haarschaft weiter ins Epithel vorstößt (Stadium 6), gewinnen sie eine längliche, flache Form, die parallel zum Haarschaft liegt (Abbildung 4-3 a, b, c). In diesem Stadium hat die ICE IR in der proximalen ÄWS und IWS sehr nachgelassen. Der Haarschaft hat die Haarbeet- (Bulge-)region erreicht, in diesem Follikelanteil ist die ICE IR in der ÄWS, der IWS (Konus), der TD und des Infundibulums stark und bleibt es bis ins Stadium 8 (Abbildung 4-3 b, c, e, f, g; Abbildung 4-4 b). Die TUNEL+ Zellen nehmen mit der Entwicklung weiter zu. Im Stadium 7 liegen die TUNEL+ Zellen vor allem in der mittleren und distalen IWS, diese Zellen sind fast immer langgestreckt und liegen parallel zum Haarschaft. Im Epithel des Haarkanals erscheinen nun auch TUNEL+ Zellen, sie sind meist von rundlicher Form (Abbildung 4-3 d, e, g). Gelegentlich finden sich auch TUNEL+ Zellen in der Medulla des Haarschaftes (Abbildung 4-3 f, vergleiche mit Abbildung 1-1 rechts).



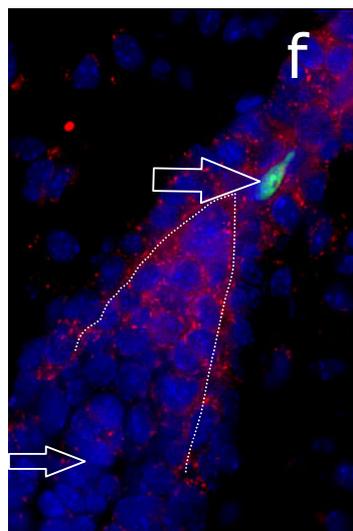
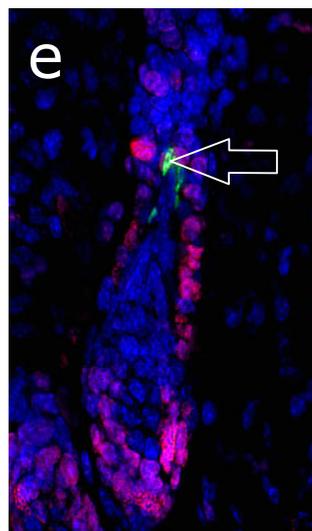
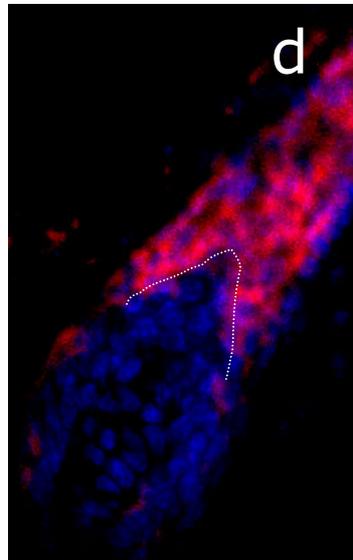
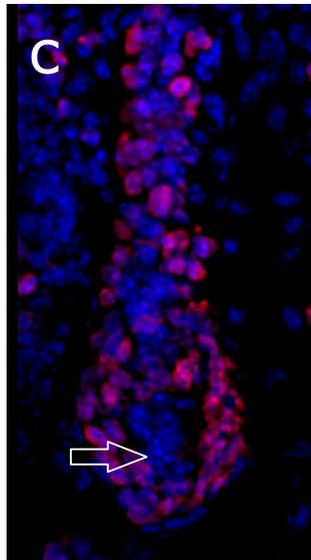
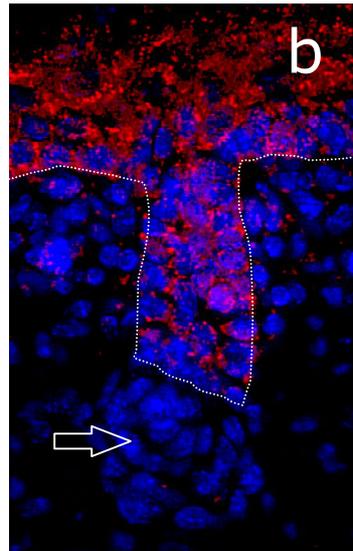
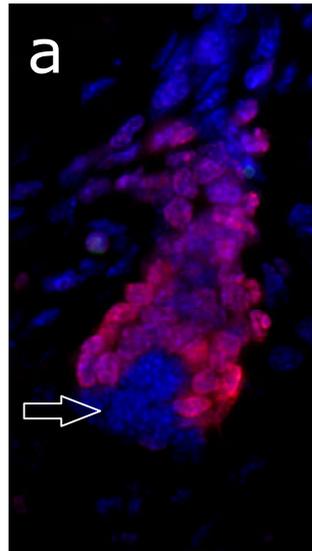
**Abbildung 4-1, Doppelfärbung TUNEL-Ki67 (links) und TUNEL-ICE (rechts) der Haarfollikelmorphogenese der Stadien 0 bis 2**

**Abbildung 4-1, Doppelfärbung TUNEL-Ki67 (links) und TUNEL-ICE (rechts) der Haarfollikelmorphogenese der Stadien 0 bis 2**

- a) Stadium 0 der Haarfollikelmorphogenese, vereinzelte Ki67+ Zellen in der basalen Zellschicht Epidermis, TUNEL+ Zelle im Stratum Corneum (Pfeil)
  - b) Stadium 0, ICE-Immunreaktion (IR) in der Epidermis, TUNEL+ Zelle in der Epidermis (Pfeil)
  - c) Stadium 1, epitheliale Zellen des Haarkeims Ki67+ (großer Pfeil), Zellen der Dermis unterhalb des Haarkeims Ki67+ (kleiner Pfeil)
  - d) Stadium 1, ICE IR in der Epidermis
  - e) Stadium 2, beinahe alle Keratinozyten des Stadium 2 Haarkeimes sind Ki67+, darunter Kondensierung der Fibroblasten, die die dermale Papille bilden (kleiner Pfeil)
  - f) TUNEL+ Zelle in der Epidermis (großer Pfeil) ICE IR in allen Keratinozyten, keine IR in der Dermis. Dermale Papille (kleiner Pfeil), TUNEL+ Zelle (großer Pfeil)
- 

Im Stadium 8, dem reifen HF, zeigen sich folgende Regionen mit relativ hoher Dichte von apoptotischen Zellen: Flache, längliche Zellen finden sich in der mittleren IWS und in der distalen IWS bis zu ihrem Ende. Rundliche TUNEL+ Zellen treten vor allem im Epithel des Haarkanales auf. Die Verteilung der ICE IR ist folgende: Starke ICE IR in der Epidermis, dem Haarkanal und der distalen ÄWS. Schwache ICE IR im mittleren Follikelepithel. Keine ICE IR im proximalen HF, der Haarmatrix und der DP (Abbildung 4-4 b).

TUNEL+ Zellen finden sich über die gesamte HF MG in der Epidermis, sind im Lauf der späteren Stadien jedoch seltener. Im Rahmen dieser Arbeit war die DP zu keiner Zeit ICE+ und wies nie TUNEL+ Zellen auf. Eine schematische Zusammenfassung der TUNEL+ Zellen und der ICE IR in der HF MG findet sich in Abbildung 4-10.



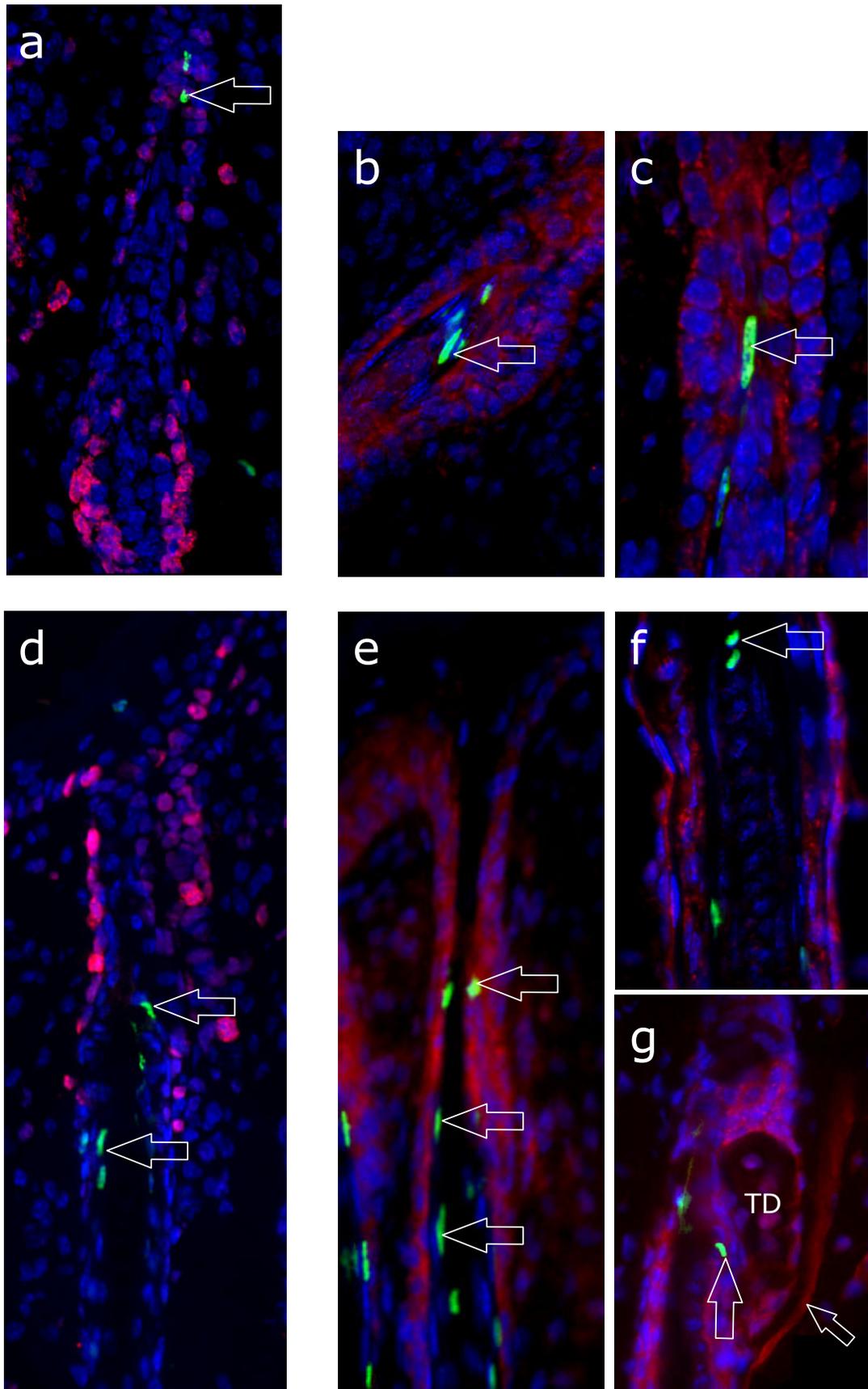
**Abbildung 4-2, Doppelfärbung TUNEL-Ki67 (links) und TUNEL-ICE (rechts) der Haarfollikelmorphogenese der Stadien 3 bis 5**

**Abbildung 4-2, Doppelfärbung TUNEL-Ki67 (links) und TUNEL-ICE (rechts) der Haarfollikelmorphogenese der Stadien 3 bis 5**

- a) beinahe alle Keratinozyten des Stadium 3 Haarzapfens sind Ki67+, dermale Papille (Pfeil) ohne IR
  - b) starke ICE IR in der Epidermis, ICE IR in den Keratinozyten des Stadium 3 Haarzapfens, dermale Papille (Pfeil) ohne IR
  - c) Proliferierende Bulbuskeratinozyten im Stadium 4 sind stark Ki67+, sie umschließen die dermale Papille (DP, Pfeil). In distal gelegenen Keratinozyten geht die Ki67 IR leicht zurück
  - d) Mit der Organisation der Zellen im Stadium 4 zum Haarkonus zieht sich die ICE IR aus den Bulbuskeratinozyten zurück, distal weiter starke ICE IR
  - e) Mit dem Beginn der Differenzierung zur Inneren Wurzelscheide, erscheinen die ersten TUNEL+ Zellen des Haarfollikels an der Spitze des Haarkonus (Pfeil). Starke Ki67 IR im Bulbus proximal der Auber'schen Linie, darüber kaum Ki67 IR, ab der mittleren Äußeren Wurzelscheide (ÄWS) wieder vereinzelte Ki67+ Keratinozyten
  - f) ICE IR weiterhin nur distal der DP (kleiner Pfeil), TUNEL+ an der Spitze des Haarkonus (gestrichelt)
- 

## **4.2 Proliferationsassoziierter Marker Ki67 während der Haarfollikelmorphogenese**

Die Doppelfärbung mit der TUNEL-Methode und dem Ki67 AK zeigt die räumliche Verteilung von Zelltod und Proliferation. Es sei darauf hingewiesen, daß das Ki67 Antigen von Zellen exprimiert wird, die die Ruhephase der Zelle verlassen haben und sich im Zellzyklus befinden. Es wurden durch Anti-Ki67 AK also nicht nur mitotische Zellen detektiert. Naturgemäß ist die Zahl der Ki67+ Zellen somit weit höher als die mit TEM oder HRLM untersuchten Mitosefiguren. Bereits in Stadium 0 der HF MG ist die gesamte Haut von reichlich Ki67+ Zellen durchsetzt. Die Zelldichte in der Dermis ist um ein Vielfaches höher als die adulter Tiere. Auch dort finden sich Ki67+ Zellen, die meisten jedoch sind im Stratum basale der Epidermis lokalisiert (Abbildung 4-1 a). Etwa die Hälfte der Zellen ist aus der Ruhephase getreten. Die Ki67 Zellen liegen regellos verteilt. Im Stadium 1 (Abbildung 4-1 c) sieht man die Zellen des Haarkeimes zusammenliegen. Sie sind alle Ki67+, haben ihre Polarisierung geändert und sind größer als die umliegenden Keratinozyten der basalen Zellschicht. Dadurch entsteht eine leichte Vorwölbung der Epidermis in die Dermis.



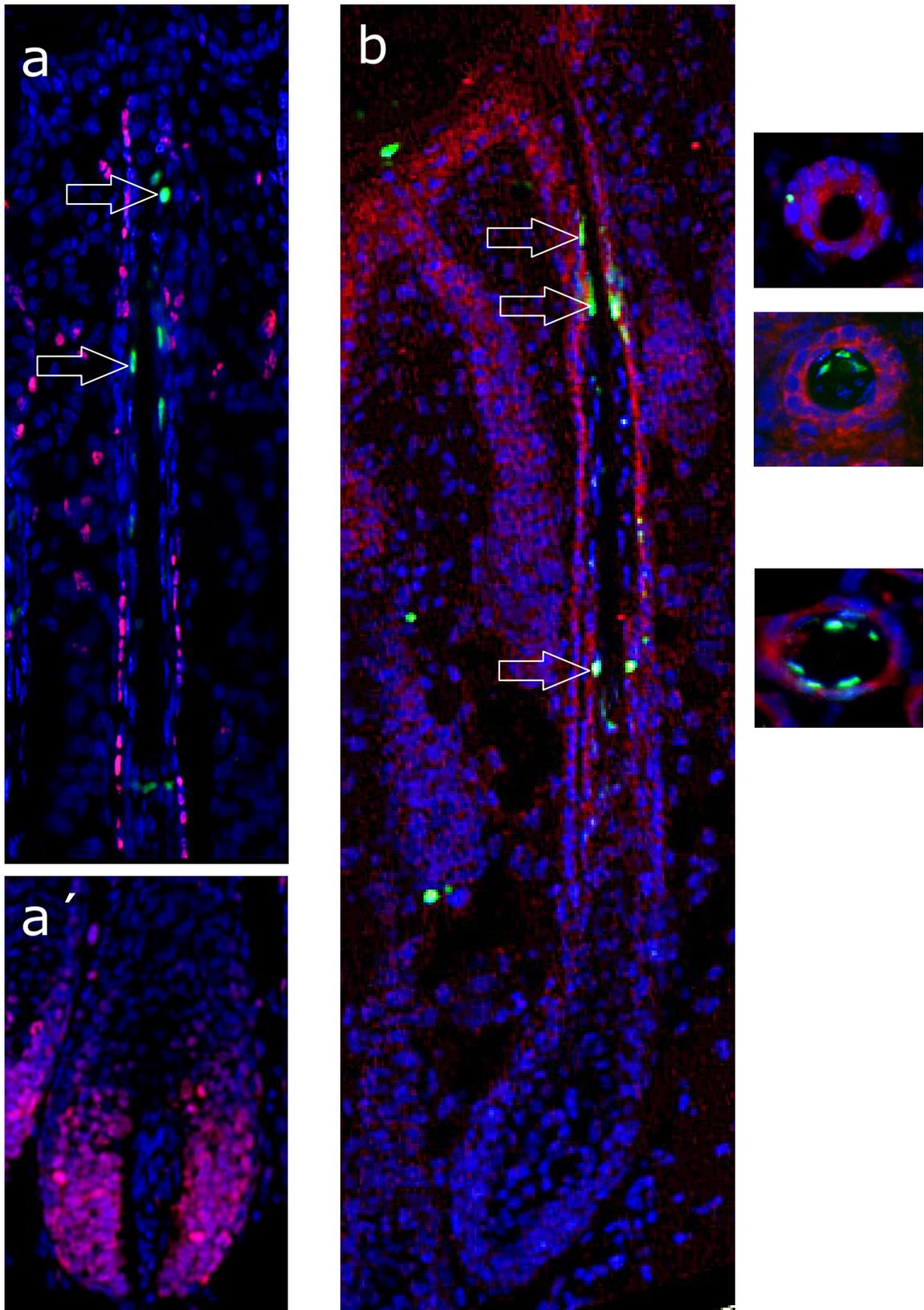
**Abbildung 4-3, Doppelfärbung TUNEL-Ki67 (links) und TUNEL-ICE (rechts) der Haarfollikelmorphogenese der Stadien 6 und 7**

**Abbildung 4-3, Doppelfärbung TUNEL-Ki67 (links) und TUNEL-ICE (rechts) der Haarfollikelmorphogenese der Stadien 6 und 7**

- a) Ki67+ der Bulbuskeratinozyten, TUNEL+ an der Spitze des epidermiswärts strebenden Haarschaftes (Pfeil)
- b) Weiterhin ICE IR in den distalen Follikelanteilen, zunehmend TUNEL+ an der Spitze des Haarschaftes. Die TUNEL+ Zellen sind zumeist von länglicher Form und liegen parallel zur Haaroberfläche (Pfeil)
- c) TUNEL+ Zelle überhalb des Haarkonus, ebenfalls in der typischen länglichen Form (Pfeil)
- d) Ki67+ Zellen entlang des Haarkanals, der von der Spitze des Haarschaftes nun erreicht wird. Parallel dazu liegen die typischen länglichen TUNEL+ Zellen (Pfeile)
- e) Verbleibende starke ICE IR in den distalen Keratinozyten um den Haarkanal. Im proximalen Haarkanal rundliche TUNEL+ Zellen (oberster Pfeil), darunter die gestreckten TUNEL+ Zellen (untere Pfeile)
- f) gelegentlich finden sich TUNEL+ Zellen in den Medullakeratinozyten (Pfeil)
- g) TUNEL+ Zellen unterhalb des Haarkanals (großer Pfeil); die randständigen Zellen der Talgdrüse (TD) und der Musculus arrector pili (kleiner Pfeil) sind ICE+

---

Unterhalb des Haarkeimes sind in diesem Stadium gelegentlich Ki67+ Fibroblasten zu sehen. Die Dynamik der proliferationsträgen Fibroblasten wird anhand der sensitiveren Ki67 ABC Färbung in Kapitel 4.5 eingehend erklärt. Im Stadium 2 der HF MG wölbt sich der Haarzapfen bereits unübersehbar in die Dermis vor. Beinahe alle epithelialen Zellen sind Ki67+, die IR ist im proximalen Anteil höher als im epidermisnahen. Die DP hat sich unterhalb des Haarzapfens deutlich aggregiert und an Zellen zugenommen, ist aber Ki67- (Abbildung 4-1 e). Im Stadium 3 beginnen die proximalen Keratinozyten die DP zu umfassen (Abbildung 4-2 a). Diese Keratinozyten, die den Bulbus formen, sind stark Ki67+, die Intensität der Ki67 IR nimmt in Richtung Epidermis leicht ab, doch nach wie vor sind fast alle epithelialen Zellen des Haarfollikels Ki67+. In Stadium 4 der HF MG lichtet die Ki67 IR leicht aus. Die Haarmatrix, die die DP nun beinahe umschlossen hat, ist weiter streng positiv, im mittleren HF sind einige Zellen ohne Ki67 IR (Abbildung 4-2 c). Dieses Bild verstärkt sich mit zunehmender Differenzierung der Zellen im Stadium 5. Weiterhin stark Ki67+ sind die Matrixkeratinozyten, die Zellen des HF sind nur in seiner mittleren ÄWS und in der Nähe der Epidermis Ki67+ (Abbildung 4-2 e). In Stadium 6 und 7 sind die Matrixkeratinozyten Ki67+, ebenso wie einzelne Zellen der mittleren ÄWS, Zellen des Haarkanals und der TD (Abbildung 4-3 a, d).



**Abbildung 4-4, Doppelfärbung TUNEL-Ki67 (links) und TUNEL-ICE (rechts) der Haarfollikelmorphogenese des Stadiums 8, ganz rechts transversale Schnitte in Höhe der Schnittebene**

**Abbildung 4-4, Doppelfärbung TUNEL-Ki67 (links) und TUNEL-ICE (rechts) der Haarfollikelmorphogenese des Stadiums 8, ganz rechts transversale Schnitte in Höhe der Schnittebene**

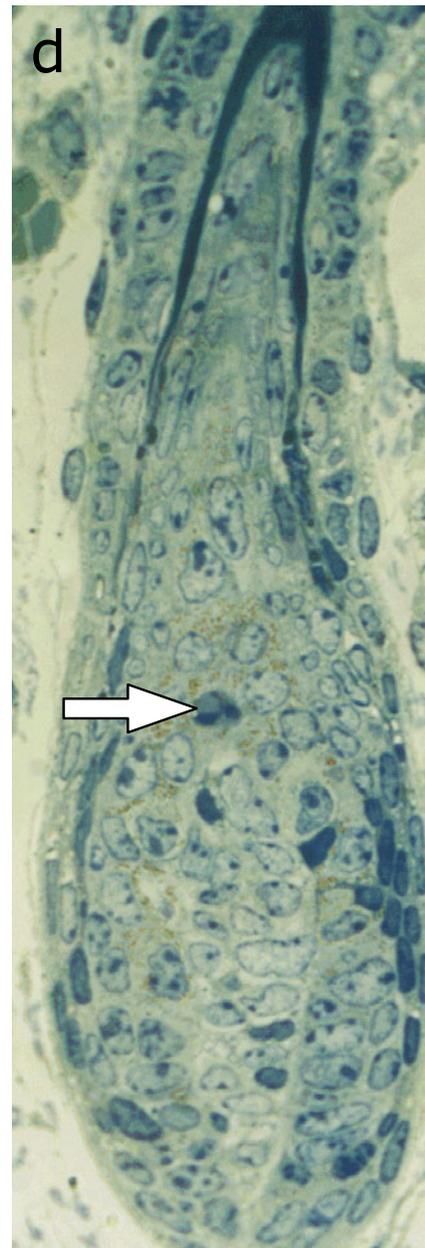
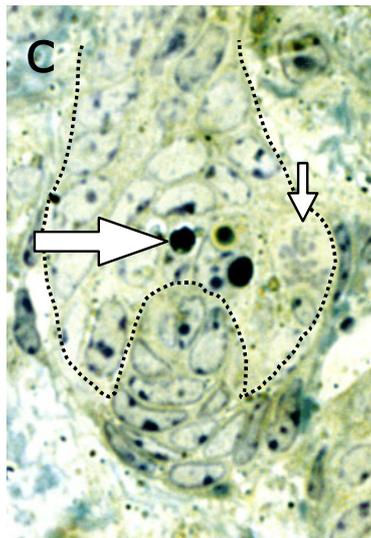
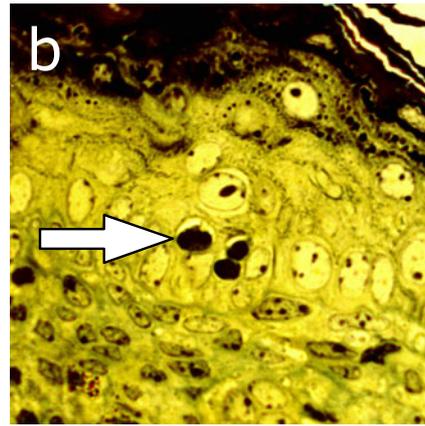
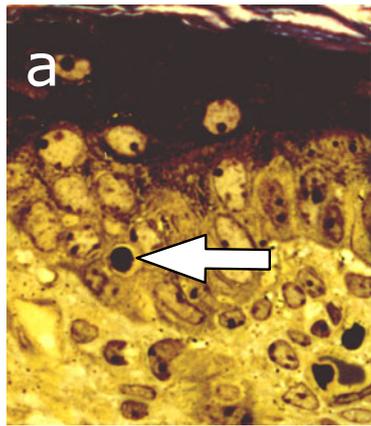
- a) rundliche TUNEL+ Zelle im proximalen Haarkanal (oberer Pfeil), gestreckte TUNEL+ Zellen in der distalen ÄWS-IWS Grenze (unterer Pfeil). Ki67+ Zellen in der distalen und der mittleren ÄWS
  - a´) Ki67+ in allen Bulbuskeratinozyten unterhalb der Auber´schen Linie
  - b) TUNEL+ Zellen im proximalen Haarkanal und in der distalen und mittleren ÄWS-IWS-Grenze (Pfeile). TUNEL+ Zelle in der Epidermis. Die ICE IR ist in der Epidermis und den distalen Follikelanteilen stark, im mittleren Follikelbereich schwach und negativ im proximalen Anteil der Follikelkeratinozyten
  - c) Transversale Schnitte rechts von b: oberstes Bild: TUNEL+ Signal in der ÄWS des Haarkanales, mittleres Bild: TUNEL+ Zellen im distalen Haarfollikel, unteres Bild: TUNEL+ Zellen im mittleren Haarfollikel
- 

Im Stadium 8 zeigen sich folgende Regionen mit hoher Dichte von Ki67+ Zellen: Die Keratinozyten des Bulbus sind fast alle Ki67+ bis knapp über die Auber´sche Linie (Abbildung 4-4 a´). Anschließend proximal sind kaum Zellen Ki67+, erst in der mittleren ÄWS finden sich einzelne Zellen mit Ki67 IR (Abbildung 4-4 a). Weiter proximal sind ebenfalls kaum Ki67+ Zellen, bis zur distalen ÄWS und dem Haarkanal. In diesen Regionen befinden sich wieder einzelne Ki67+ Zellen. Ki67+ Zellen finden sich über die gesamte HF MG in der basalen Schicht der Epidermis, werden im Lauf der späteren Stadien jedoch seltener. Die DP ist mit dieser Methode nicht Ki67+, mit sensitiveren Methoden ließ sich auch dort Ki67 IR nachweisen (Kapitel 4.5). Eine schematische Zusammenfassung der Ki67 IR findet sich in Abbildung 4-16.

### **4.3 Beobachtungen mit der hochauflösenden Lichtmikroskopie in der Haarfollikelmorphogenese**

Während mit der TUNEL Färbung die ersten apoptotischen Zellen im Stadium 5 der HF MG an der Spitze des Haarkonus entdeckt wurden, zeigten sich überraschenderweise in der hochauflösenden Lichtmikroskopie (HRLM, high resolution light microscopy) apoptotische Zellen schon in den frühesten Stadien. Die Ursache dieser Diskrepanz konnte nicht aufgeklärt werden.

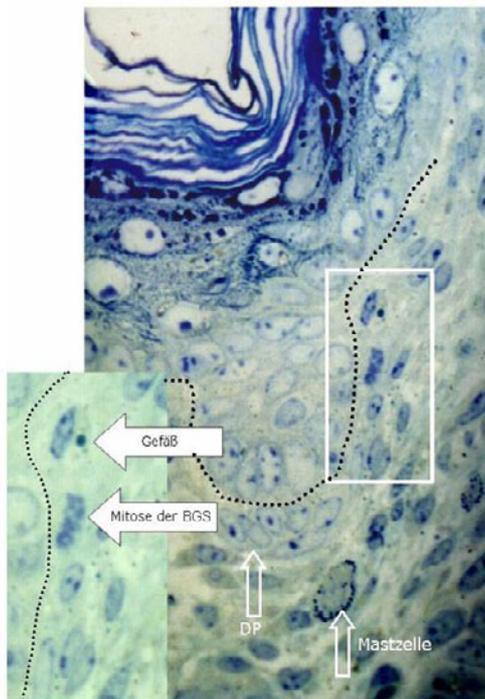
Bereits in den Stadien 1-2 der HF MG finden sich eindeutig apoptotische Zellen in der suprabasalen Zellschicht (Abbildung 4-5 a, b). Diese treten einzeln (a) oder in Häufungen von 2-3 Zellen (b) auf. Sie weisen ein stark angefärbtes Zytoplasma, lichtdichte basophile, pyknotische Nuklei, Zellschrumpfung und Kontaktverlust auf, der einen Halo um die Zelle erzeugt. Apoptose und Proliferation treten in diesen frühen Stadien gleichzeitig und in enger Nachbarschaft auf (Abbildung 4-5 c). Anhäufungen apoptotischer Zellen finden sich auch im Stadium 3-4. Direkt über der bald von Keratinozyten umschlossenen DP zeigen sich mehrere apoptotische Zellen (Abbildung 4-5 c). Bis zu diesem Stadium weichen die Beobachtungen durch TUNEL Färbung und HRLM deutlich voneinander ab. Im Stadium 5 zeigen sich an der Spitze des Haarkonus lichtdichte, pyknotische, längliche Zellkerne in der IWS (Abbildung 4-5 e), die parallel zur entstehenden IWS angeordnet sind. Apoptose zeigt sich in Stadium 6 HF, es zeigen sich Zellschrumpfung, Zytoplasmaverdichtung und Chromatinkondensation als typische Morphologika der Apoptose in einem Matrixkeratinozyten direkt oberhalb der DP (Abbildung 4-5 d). Auch diese Lokalisation apoptotischer Zellen entging dem Nachweis mit der TUNEL Färbung. An den mit der TUNEL Färbung in den späteren Stadien der HF MG entdeckten Lokalisationen fanden sich in der HRLM entsprechende Korrelate, die der besseren Beurteilbarkeit halber im nächsten Kapitel TEM besprochen werden.



**Abbildung 4-5, hochauflösende Lichtmikroskopie an Semidünnschnitten, Apoptose in der Haarfollikelmorphogenese in verschiedenen Stadien**

**Abbildung 4-5, hochauflösende Lichtmikroskopie an Semidünnschnitten, Apoptose in der Haarfollikelmorphogenese in verschiedenen Stadien**

- a) apoptotische Zelle (Pfeil) im Haarkeim des Stadium 1 zeigt typische Merkmale der Apoptose: Kondensation des Chromatin, Schrumpfung und Rundung der Zelle, Kondensation des Zytoplasmas.
- b) 3 apoptotische Zellen im Stadium 1 der Haarfollikelmorphogenese (Pfeil)
- c) drei apoptotische Zellen in der Haarmatrix (großer Pfeil) in nächster Nähe einer mitotischen Zelle (kleiner Pfeil). Stadium 3
- d) Apoptose in der Haarmatrix (Pfeil) eines Haarfollikels (HF) im Stadium 6
- e) Bildung der Inneren Wurzelscheide im Stadium 4. An der Spitze des Haarkonus dunkle, längliche Zellen (Pfeil), die pyknotisch erscheinen



**Abbildung 4-6, HRLM, Stadium 2 der Haarfollikelmorphogenese: Proliferation in der BGS**

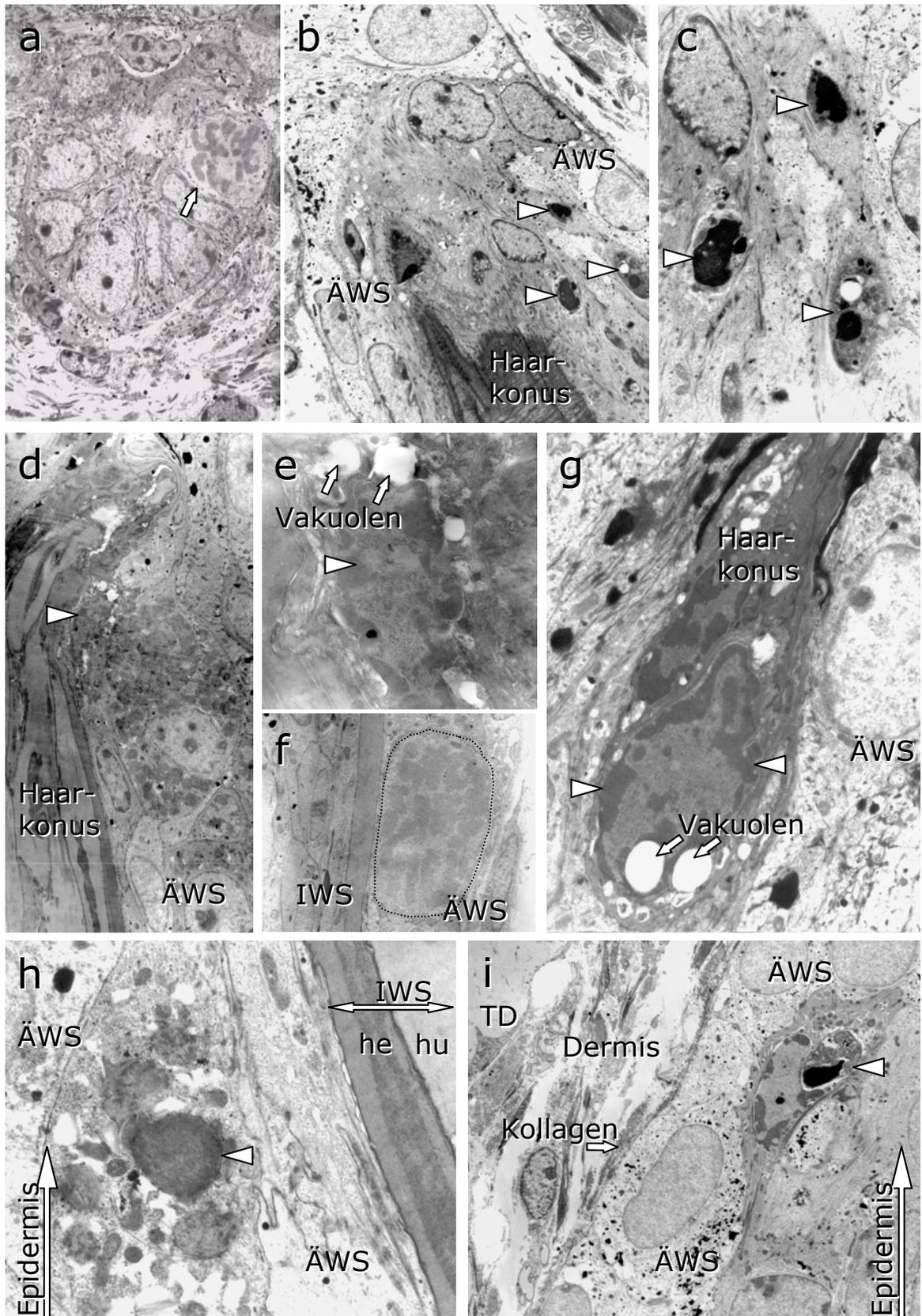
Mitosefiguren fanden sich in der Verteilung, die die Ki67 Immunreaktion erwarten ließ. Vor allem in den späteren Stadien sind in den Bulbi regelmäßig mehrere Zellen in mitotischer Teilung begriffen. Weiter finden sich Mitosefiguren in der mittleren ÄWS, der TD Peripherie und im Haarkanal. Die Auflösung der anatomischen Details in der Immunfluoreszenz ist mäßig, daher überraschte bei Betrachtung mit HRLM das Vorhandensein mitotischer Zellen in der BGS der frühen Stadien der HF MG (Abbildung 4-6). In Abbildung 4-9 ist die Proliferation mesenchymaler Zellen anhand von gegenübergestellten Aufnahmen mit HRLM und sensitiver Ki67 ABC Methode ausführlich dokumentiert.

## **4.4 Beobachtungen mit der Transmissionselektronenmikroskopie in der Haarfollikelmorphogenese**

Nach wie vor ist die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) der Goldstandard zur Beurteilung apoptotischer Zellen. Sie ermöglicht es, den Fortschritt des apoptotischen Prozesses zu verfolgen und zwischen Zelldegeneration, Nekrose und Apoptose zu unterscheiden. Dazu ist die Spezifität der TUNEL Färbung zu gering und die Auflösung der HRLM zu niedrig. Hingegen ist die TEM denkbar ungeeignet, wenn es gilt, eine große Anzahl von Haarfollikeln nach solchen Zellveränderungen zu scannen, gleichzeitig deren Lokalisation genau zu bestimmen und das Haarfollikelstadium einzuschätzen. Jeder aufwendig prozessierte Gewebeschnitt von etwa  $1\text{mm}^3$  enthält nur wenige Haarfollikel, deren erwünschter longitudinaler Anschnitt nur bedingt beeinflussbar ist und große Teile des Schnittes sind durch das Gitternetz des Trägergrids verdeckt. Mit den vorliegenden Ergebnissen der TUNEL und der Ki67 Färbung und den Auswertungen der HRLM konnte die Suche auf die interessanten Punkte konzentriert werden.

Entsprechend den Ergebnissen der Ki67 Färbung sind mitotische Zellen häufig im Follikel epithel der HF aller Stadien zu finden. In den frühen Stadien (1-3) findet Proliferation in allen epithelialen Bereichen des Haarzapfens statt (Abbildung 4-7 a). In den Stadien 4-8 konzentriert sich die proliferative Aktivität vor allem in der Haarmatrix, geringer in der mittleren ÄWS (Abbildung 4-7 f) und dem Epithel des Haarkanals.

Für die in der TUNEL Färbung entdeckten positiven runden (Stadium 5-6) und länglich-flachen (Stadium 6-8) Zellen über und im Haarkonus und der IWS wurden die elektronenmikroskopischen Korrelate gefunden. In den Zellen über der und um die vorwachsene IWS und den Haarkonus sind regelmäßig apoptotische Zellen und internalisierte apoptotic bodies zu finden, die auch von Robins (Robins und Breathnach, 1969; Robins, 1974) beobachtet wurden.

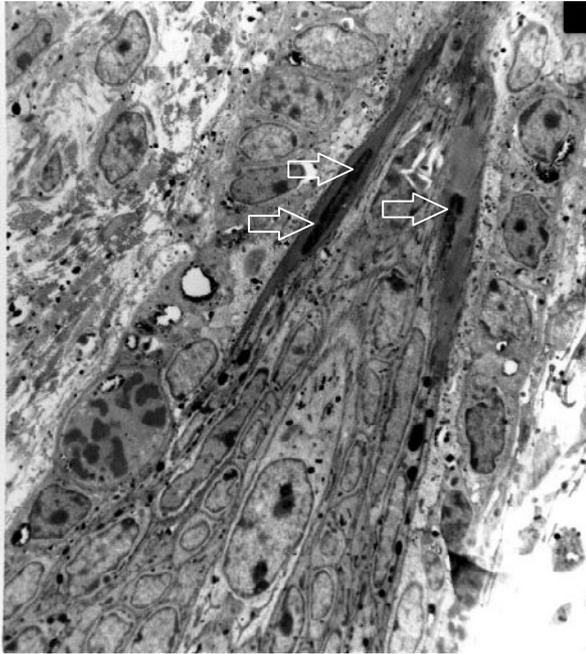


**Abbildung 4-7, Transmissionselektronenmikroskopie, Proliferation und Apoptose in verschiedenen Stadien der Haarfollikelmorphogenese**

## **Abbildung 4-7, Transmissionselektronenmikroskopie, Proliferation und Apoptose in verschiedenen Stadien der Haarfollikelmorphogenese**

- a) Mitosefigur im Stadium 2 (Pfeil)
  - b) Spitze des Haarschaftes (Haarkonus). Drei apoptotische Keratinozyten an der Grenze zur ÄWS (Pfeilspitzen). Stadium 5 oder 6
  - c) Ausschnitt von b), drei apoptotische Zellen (Pfeilspitzen) mit klassischen Merkmalen der Apoptose: Zellschrumpfung, Chromatinkondensation, Vakuolisierung und Erhalt der Zellorganellen (rechts unten)
  - d) der Haarschaft passiert einen Sebozyten (rechts vom Haarkonus), darüber (Pfeilspitze) apoptotische Zelle. Stadium 6
  - e) Ausschnitt von d), geschrumpfte apoptotische Zelle (Pfeilspitze) und Vakuolen (Pfeile)
  - f) Mitosefigur in der ÄWS
  - g) Haarkonus mit apoptotischer Zelle (begrenzt durch Pfeilspitzen). Die Zelle ist geschrumpft, es bilden sich cytoplasmatische Vakuolen (Pfeile), Margination des Chromatins. Stadium 6
  - h) Degenerierende Zelle in der mittleren ÄWS eines Stadium 8 HF. Es fehlen die typischen Merkmale der Apoptose. Die Zelle ist kaum geschrumpft, nukleäres Material ballt sich zusammen. Recht daneben die IWS, bestehend aus Henle- und Huxleyschicht. Der große Pfeil weist in Richtung Epidermis
  - i) apoptotischer Einschlusskörper (Pfeilspitze) in einem Keratinozyten der distalen ÄWS. Der apoptotic body besteht aus elektronendichtem Kernmaterial und kondensiertem Zytoplasma. Reichlich Glykogen in den randständigen Keratinozyten. Kollagenfibrillen in der Dermis, links oben die Talgdrüse. Der große Pfeil weist in Richtung Epidermis.
-

Sie sind nicht so zahlreich, als daß sie das Lumen für den folgenden Haarschaft allein freiräumen könnten, doch scheint die dem Haarschaft vorangehende



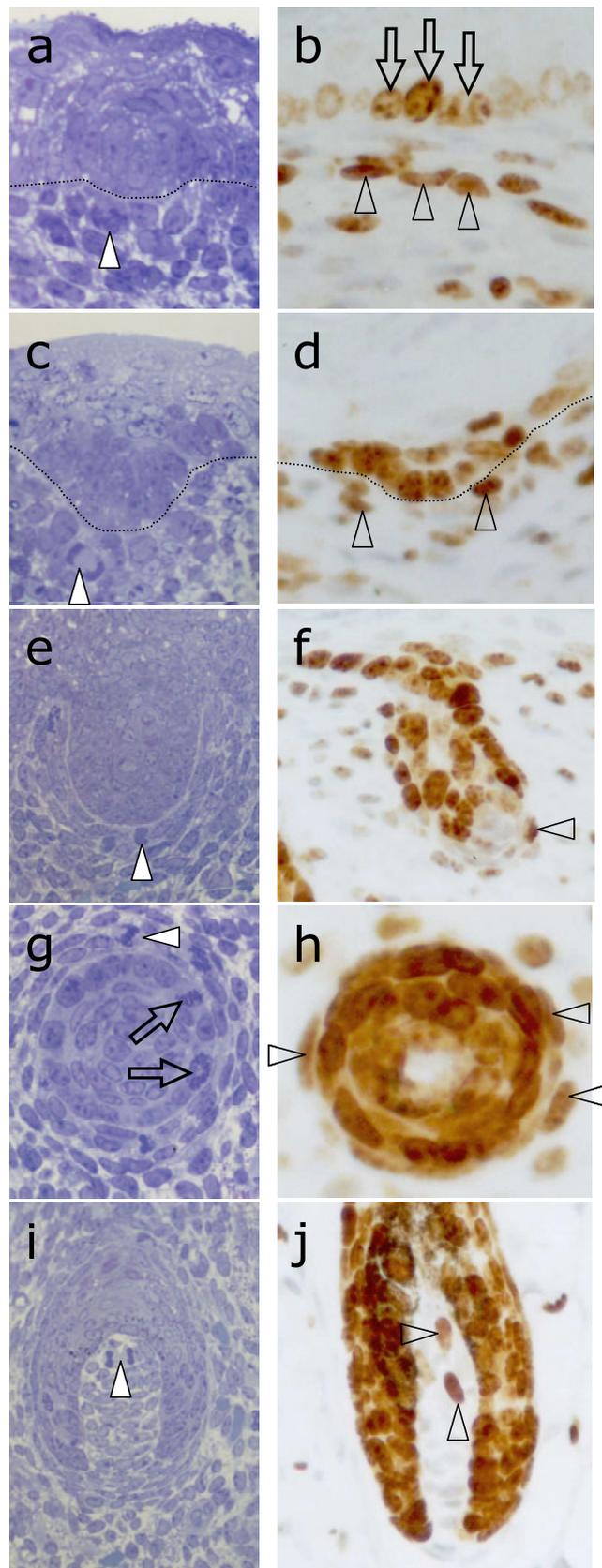
**Abbildung 4-8, TEM, entstehender Haarkonus**

An den Seiten des Haarkonus in der Henle Schicht liegen langgestreckte, elektronendichte Zellkerne (Pfeile). Links in der ÄWS Mitosefigur.

Zellauslöschung im Zentrum der Längsachse des Follikels das Durchstoßen des Schaftes auf dem Weg zur Epidermis zu erleichtern (Abbildung 4-7 b, c, d, e, g). Die ab dem Stadium 6 häufig beobachteten länglich-ovalen TUNEL+ Zellen an der Spitze des Haarkonus und in der mittleren und distalen IWS konnten mittels der TEM als die ebenso geformten Kerne der differenzierenden IWS Keratinozyten identifiziert werden (Abbildung 4-7 h, Kern in der IWS (he) und Abbildung 4-8). Die Ursache der in den Stadien 7 und 8 beobachtete Häufung von TUNEL+ Zellen in der mittleren und der distalen IWS und die beinahe fehlende TUNEL+ der dazwischenliegenden Zellkerne der

Henleschicht konnte durch TEM nicht erklärt werden.

Die TEM bestätigte die TUNEL+ Zellen der distalen ÄWS und der ÄWS im Isthmusbereich der späten Stadien 7 und 8 meist als Apoptose (Abbildung 4-7 i), wenn auch gelegentlich degenerierende Zellen oder selten gar untergehende Zellen mit nekrotischen Merkmalen entdeckt werden konnten (Abbildung 4-7 h).



**Abbildung 4-9, Dynamik der Fibroblasten in der Haarfollikelmorphogenese. Toluidinblau (links) und Ki67 Antikörperreaktion**

## **Abbildung 4-9, Dynamik der Fibroblasten in der Haarfollikelmorphogenese. Toluidinblau (links) und Ki67**

### **Antikörperreaktion**

- a) Mitosefigur in der Dermis unterhalb des Stadium 1 Haarkeimes (Pfeilspitze)
  - b) starke Ki67 IR in den Keratinozyten des Haarkeimes im Stadium 1 (Pfeile), darunter Ki67 IR in dermalen Fibroblasten (Pfeilspitzen)
  - c) Stadium 1-2, Mitosefigur in der Dermis unterhalb Haarkeimes (Pfeilspitze)
  - d) Ki67 IR in den Keratinozyten des Haarkeimes im Stadium 1-2, darunter Ki67 IR in dermalen Fibroblasten (Pfeilspitzen)
  - e) mitotische Zelle in der Dermis unterhalb des Stadium 2 Haarzapfens (Pfeilspitze)
  - f) Ki67 IR in den Keratinozyten des Haarzapfens Stadium 2-3, einzelner Ki67+ Fibroblast an der bereits kondensierten DP (Pfeilspitze)
  - g) Transversalschnitt durch HF Stadium 4, Mitosefiguren im Follikelepithel (Pfeile) und im Mesenchym (Pfeilspitze)
  - h) Ki67+ aller Keratinozyten des HF, mesenchymale Zellen der BGS Ki67+ (Pfeilspitzen)
  - i) Stadium 4 HF, Mitose in der DP (Pfeilspitze)
  - j) Stadium 5 HF, Ki67 IR in Zellen der DP (Pfeilspitzen)
- 

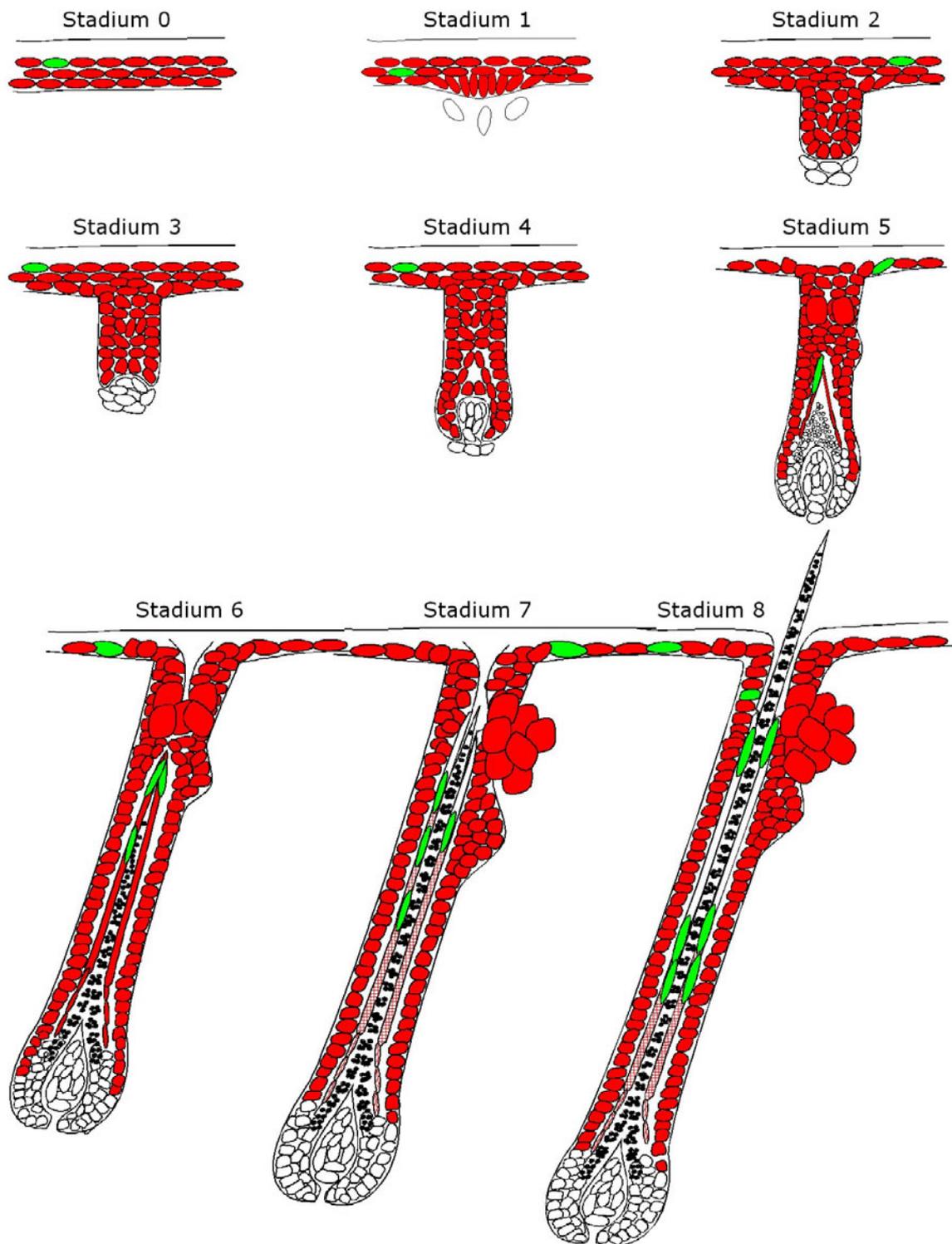
## **4.5 Proliferation und Migration tragen zur Zellaggregation der dermalen Papille bei**

Bei der Beobachtung der Haarfollikelmorphogenese mittels HRLM fielen in Proliferation begriffene dermale Fibroblasten auf, die der Ki67 Immunfluoreszenzfärbung wegen der schlechten Auflösung anatomischer Details und nicht ausreichender Sensitivität entgangen waren. Daher wurde eine Ki67 ABC Einfachfärbung angewandt, die diese Nachteile nicht aufweist. Die Bilder der Ki67 Färbung wurden den entsprechenden HRLM Bildern gegenübergestellt (Abbildung 4-9). Zwar konnten in allen Stadien der HF MG Mitosen und Ki67+ dermale Zellen nachgewiesen werden, sie sind jedoch viel seltener als proliferierende epitheliale Zellen.

Im Stadium 1 der HF MG findet sich in der basalen Zellschicht der Epidermis eine Verdichtung von vergrößerten Keratinozyten, die eine ovale Form annehmen und sich mit ihrer Längsachse quer zur Epidermis aufrichten (Abbildung 4-9 a, b). Das Stadium 1-Kriterium der Fibroblastenaggregation unterhalb dieser Haaranlage ist in der zellreichen Dermis schwer auszumachen, doch ist an diesen Stellen die Zahl der Mitosen und die Zahl der Ki67+ Zellen im Vergleich zum dermalen Umfeld deutlich erhöht (Abbildung 4-9 a, b). Im Stadium 1-2 sind die

Mitosefiguren und die Ki67+ Zellen weiterhin unter dem Haarkeim zu finden (Abbildung 4-9 c, d). So auch im Stadium 2-3, doch zusätzlich zeigen sich Mitosefiguren und Ki67+ Zellen seitlich des Haarfollikelepithels in der BGS (Abbildung 4-6 und Abbildung 4-9 e, f). Die im Stadium 3 sphärisch aggregierte DP weist selten Mitosen oder Ki67+ Zellen in ihren zentralen Zellen auf, meist sind sie in der proximalen Peripherie der DP oder der direkt daran anschließenden BGS. Im Stadium 3-4 erreicht die proliferative Aktivität der BGS ihren Höhepunkt. Es finden sich Mitosen und Ki67+ Zellen entlang des proximalen und mittleren HF. In den transversalen Schnitten durch mittlere HF im Stadium 4 (Abbildung 4-9, g, h) zeigen sich sowohl Mitosen und starke Ki67 IR im Follikelepithel als auch in der BGS. Die in Abbildung 4-9 i gezeigte postmitotische Zelle inmitten der DP eines Stadium 4 HF und die Ki67+ Zelle in der DP eines Stadium 5 HF (Abbildung 4-9 j) sind seltene Ereignisse, die gelegentlich in Stadium 4-6 HF gesehen werden, in reifen HF des Stadium 8 wurden sie im Rahmen dieser Studie nicht beobachtet.

Die umseitige Abbildung 4-10, Schematische Zusammenfassung der TUNEL- und ICE-positiven Zellen und Regionen in der Haarfollikelmorphogenese. Die Ergebnisse dieser Färbungen sind im Kapitel 4.1 beschrieben.



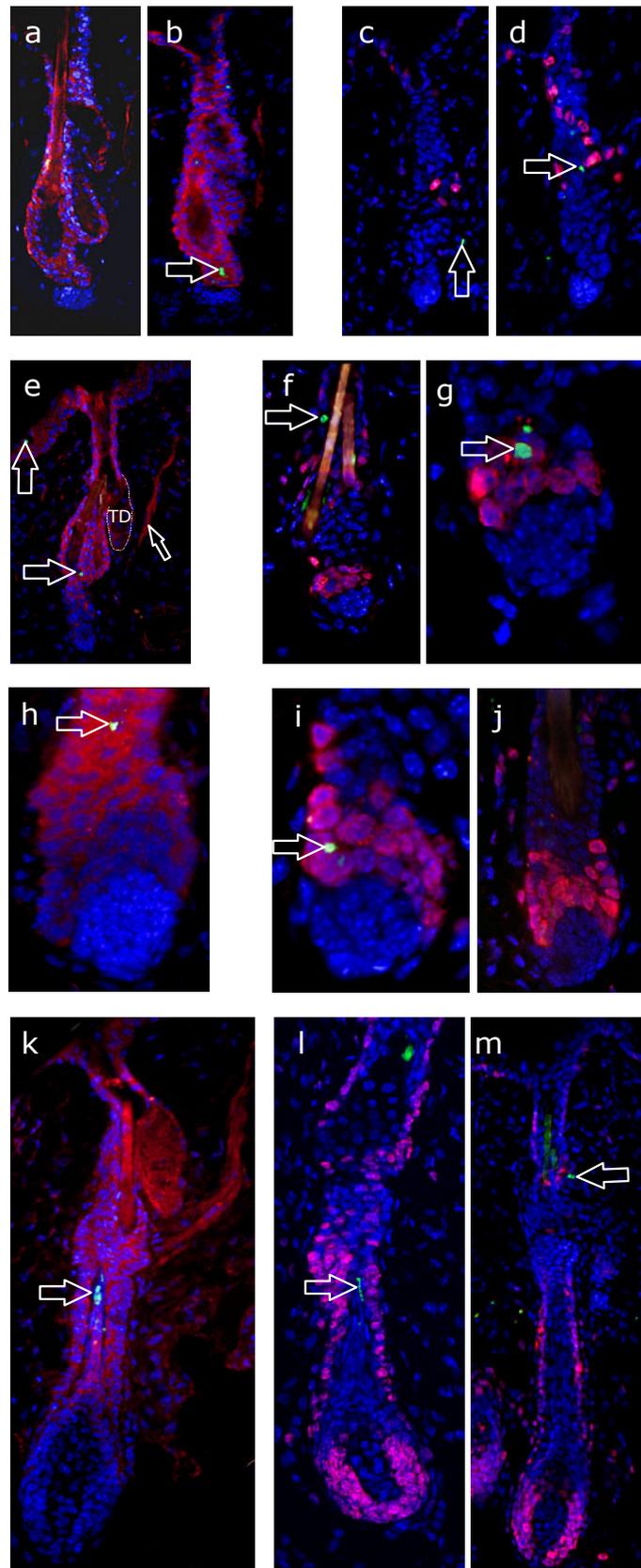
**Abbildung 4-10, Schematische Zusammenfassung der TUNEL- und ICE-positiven Zellen und Regionen in der Haarfollikelmorphogenese.**

TUNEL: grün; ICE: rot.

## **4.6 Apoptoseassoziierte Marker (TUNEL-Positivität und ICE Immunreaktion) in Telogen und Anagen des Haarzyklus**

Die einleitenden Bemerkungen über die TUNEL Färbung und den Caspase-1 Antikörper im Kapitel 4.1 "Apoptoseassoziierte Marker (TUNEL-Positivität und ICE Immunreaktion) in der Haarfollikelmorphogenese" sind in vollem Umfang auch für dieses Kapitel gültig.

Nachdem der HF im Katagen eine massive apoptosegesteuerte Regression erfahren hat (Lindner *et al*, 1997), tritt der HF ins Telogen, das häufig als Ruhestadium bezeichnet wird. Obwohl in diesem Stadium allgemein eine geringe Aktivität beobachtet wird, sind Telogenfollikel nicht völlig inert. ICE IR wird im gesamten HF Epithel und der Epidermis beobachtet (Abbildung 4-11 a, b). Einzelne TUNEL+ Zellen finden sich im epithelialen Strang (Abbildung 4-11 b), im sekundären Haarkeim (Abbildung 4-11 c) und um die Verankerung des Kolbenhaares herum (Abbildung 4-11 d). Im Anagen I verliert der proximalste Anteil des wachsenden epithelialen Strangs seine ICE IR, im übrigen HF bleibt sie erhalten (Abbildung 4-11 e). TUNEL+ Zellen befinden sich in der Proliferationszone des epithelialen Stranges (Abbildung 4-11 g), im sekundären Haarkeim (Abbildung 4-11 e) und am verbliebenen Haarschaft des Kolbenhaars (Abbildung 4-11 f). Im Anagen II verliert der die DP umschließende Teil der Keratinozyten weiter an ICE IR (Abbildung 4-11 h). TUNEL+ Zellen sind sowohl in ICE+ Keratinozyten (Abbildung 4-11 h) als auch in den proximal davon gelegenen ICE- Keratinozyten zu finden (Abbildung 4-11 i). Im Anagen III und den folgenden Stadien ähnelt das Bild der Verteilung der apoptoseassoziierten Marker TUNEL und ICE der der Morphogenese Stadium 5 und deren folgenden Stadien. An der Spitze des Haarkonus sind längliche, flache TUNEL+ Keratinozyten (Abbildung 4-11 k, l). Einzelne TUNEL+ Zellen sind in der distalen ÄWS zu sehen (Abbildung 4-11 m). Stark ICE+ sind die TD, der MAP, die Keratinozyten des distalen Follikels, schwächer die Keratinozyten des proximalen Follikels und negativ die Zellen des Bulbus und der DP (Abbildung 4-11 k).

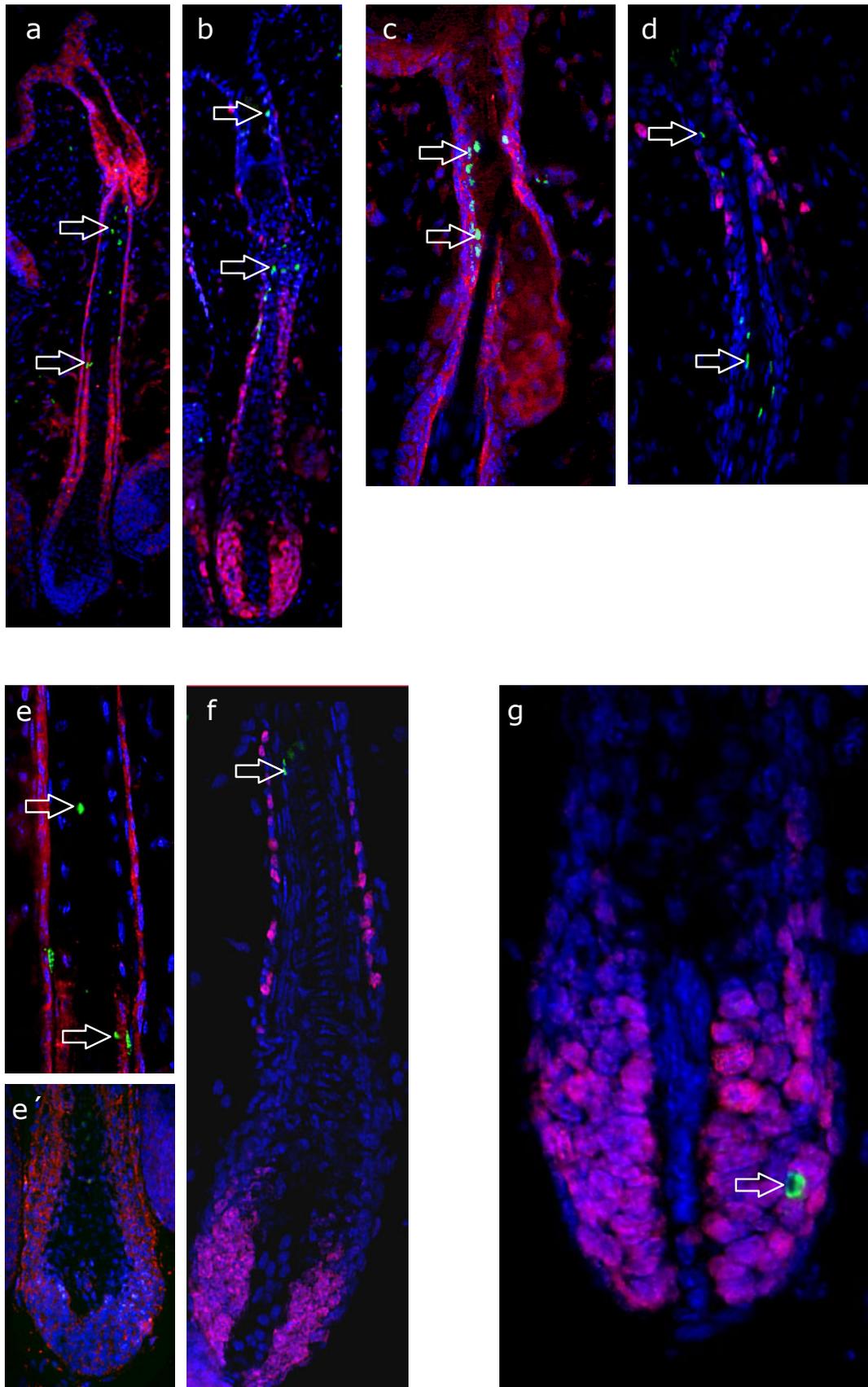


**Abbildung 4-11, Doppelfärbung TUNEL-Ki67 (rechts) und TUNEL-ICE (links) des Telogens und der Anagenstadien I bis III**

**Abbildung 4-11, Doppelfärbung TUNEL-Ki67 (rechts) und TUNEL-ICE (links) des Telogens und der Anagenstadien I bis III**

- a) Telogenfollikel, starke ICE IR im epithelialen Anteil, keine IR der DP
  - b) Telogenfollikel, starke ICE IR im epithelialen Anteil, TUNEL+ Zelle im epithelial strand (ES) (Pfeil)
  - c) Telogenfollikel, vereinzelte Ki67+ Zellen im distalen Follikel, TUNEL+ Zelle im Keimepithel (Pfeil)
  - d) Telogenfollikel, Ki67+ Zellen im distalen Follikel, TUNEL+ Zelle im mittleren Follikel (Pfeil)
  - e) Anagen I HF, keine ICE IR mehr im ES, TUNEL+ Zellen in der Epidermis und im Follikelepithel (große Pfeile). ICE IR in der TD und im MAP (kleiner Pfeil)
  - f) Ki67 IR im ES als Zeichen für beginnendes Anagen, TUNEL+ Zelle im mittleren Follikel
  - g) Anagen I HF, Ki67+ in den Zellen des ES, TUNEL+ Zelle in unmittelbarer Nachbarschaft
  - h) ICE IR zieht sich aus den bulbusformenden Keratinozyten zurück, darüber TUNEL+ Zelle (Pfeil), Anagen II
  - i) Anagen II, wie ein Negativ der ICE-IR sind die Keratinozyten über der DP stark Ki67+. Inmitten der proliferierenden Zellen eine TUNEL+ Zelle
  - j) die starke Ki67 IR beschränkt sich auf den veränderlichen Teil des HF, Anagen II
  - k) Anagen III, starke ICE IR im distalen HF, der TD und des MAP. TUNEL+ Zelle an der Spitze des entstehenden Haarschaftes
  - l) Ki67 IR in den Keratinozyten des Bulbus und in der ÄWS. TUNEL+ Zelle an der Spitze des entstehenden Haarschaftes (Pfeil), weitere TUNEL+ Zelle im distalen HF. Anagen III
  - m) Anagen III HF, Ki67 IR im Bulbus und der ÄWS, TUNEL+ Zelle in der TD (Pfeil)
- 

Wenn im Anagen IV der Haarschaft den Isthmus erreicht, bleibt der distale HF samt Anhangsgebilden stark ICE+, der mittlere Anteil des HF ist schwächer ICE+ und keine ICE IR findet sich im Bulbus und der DP. Flache TUNEL+ Zellen fallen auf in der mittleren IWS und in der diastalen IWS (Abbildung 4-12 a, b). Runde TUNEL+ Zellen erscheinen im Epithel des Haarkanals (Abbildung 4-12 b). In Anagen V finden sich die TUNEL+ Zellen an denselben Lokalisationen, ihre Häufigkeit, vor allem im Epithel des Haarkanals, nimmt zu (Abbildung 4-12 c, d). Die ICE IR der Epidermis, des distalen HF und der TD ist nach wie vor kräftig ausgeprägt, der mittlere und der proximale HF Abschnitt zeigen schwächere ICE IR. Bulbuskeratinozyten und DP sind ICE- (Abbildung 4-12 c). Im Anagen VI zeigt die ICE IR in den distalen Bereichen des HF die stärkste Ausprägung, schwach ICE+ sind die distale ÄWS und schwächer noch die proximale ÄWS und IWS (Abbildung 4-12 e). Die schwache ICE IR erreicht den Bulbus, reicht aber nie proximal der Auber'schen Linie (Abbildung 4-12 e').



**Abbildung 4-12, Doppelfärbung TUNEL-Ki67 (rechts) und TUNEL-ICE (links) der Anagenstadien IV bis VI und des Katagen I**

**Abbildung 4-12, Doppelfärbung TUNEL-Ki67 (rechts) und TUNEL-ICE (links) der Anagenstadien IV bis VI und des Katagen I**

- a) Anagen IV HF, starke ICE IR im distalen HF, ICE IR im mittleren HF. TUNEL+ Zellen in der IWS im mittleren und distalen HF (Pfeile)
  - b) Anagen IV HF, Ki67 IR im Bulbus und der mittleren ÄWS. TUNEL+ Zellen im mittleren HF und im Haarkanal (Pfeile)
  - c) Anagen V HF, starke ICE IR in der Epidermis, dem Haarkanal und der TD. Zahlreiche TUNEL+ Zellen im Haarkanal und Isthmus (Pfeile)
  - d) vereinzelte Ki67+ Zellen im Haarkanal, dem distalen Follikel und der TD. TUNEL+ Zellen im distalen HF und Haarkanal (Pfeile)
  - e) ICE IR im mittleren Anagen VI HF in der ÄWS und schwächer in der IWS. TUNEL+ Zellen in der IWS, ÄWS und der Medulla des Haarschaftes (Pfeile)
  - e´) keine ICE IR im Bulbus und der DP, schwache ICE IR in der proximalen ÄWS und IWS
  - f) starke Ki67 IR in den Bulbuskeratinozyten und der mittleren ÄWS, TUNEL+ Zelle in der mittleren IWS (Pfeil)
  - g) Katagen I HF, als eines der ersten Zeichen des Überganges vom Anagen VI zum Katagen finden sich TUNEL+ Zellen in den Matrixkeratinozyten ohne daß die Ki67 IR schwächer wird (Pfeil)
- 

Die Verteilung der TUNEL+ Zellen im distalen HF entspricht der der im Anagen V beobachteten. Im mittleren HF finden sich die TUNEL+ Zellen in der IWS und gelegentlich in der Medulla (Abbildung 4-12 e). Als erstes Zeichen des beginnenden Katagens erscheinen TUNEL+ Zellen im Bulbus des HF (Abbildung 4-12 g) (Lindner *et al*, 1997). Eine schematische Zusammenfassung der TUNEL Reaktion und der ICE IR findet sich in Abbildung 4-15.

## **4.7 Proliferationsassoziierter Marker Ki67 während des Anagens**

Die einleitenden Bemerkungen des Kapitels 4.2 "Proliferationsassoziierter Marker Ki67 während der Haarfollikelmorphogenese" gelten auch für dieses Kapitel. Die Ki67 IR im Telogenfollikel beschränkt sich auf die distal des sekundären Haarkeims gelegenen Anteile des HF. Die proliferative Aktivität entspricht in etwa der der Epidermis, gelegentlich lassen sich etwas höhere Aktivitäten feststellen. Der sekundäre Haarkeim, der epitheliale Strang und die DP sind Ki67- (Abbildung 4-11 c, d). Mit dem Beginn des Anagens sind zahlreiche Zellen des epithelialen Stranges Ki67+, ohne daß sich die proliferative Aktivität im restlichen Follikel erhöhte. Die stärkste Ki67 IR findet sich in den Zellen über der DP, zwischen diesen erscheinen auch TUNEL+ Zellen (Abbildung 4-11 f, g). Als Folge der starken Proliferation beginnen die Zellen des epithelialen Stranges im Anagen II die DP zu umschließen. Weiterhin sind alle Keratinozyten in der Nähe der DP stark Ki67+, während der restliche HF nur mäßige Ki67 IR aufweist. Auch in diesem Stadium sind proliferierende und apoptotische Zellen in direkter Nachbarschaft zu finden, selbstredend mit überstarkem Gewicht der Proliferation (Abbildung 4-11 i, j). Ki67 IR und ICE IR weisen in diesem Stadium eine deutliche negative Korrelation auf (Abbildung 4-11 h, i, j), die in allen späteren Stadien in der Bulbusregion gut beobachtet werden kann. Im Anagen III beschränkt sich die starke Ki67 IR auf die Matrixkeratinozyten, in der mittleren IWS sind einige Ki67+ Zellen zu finden. Gelegentlich findet sich im Haarwulst eine Ansammlung Ki67+ Zellen, diese Beobachtung ist jedoch nicht die Regel (Abbildung 4-11 l, m). Ähnlich der ICE IR sind die Ergebnisse der Ki67 IR im Anagen III bis VI mit den Ergebnissen aus der Morphogenese Stadium 5 bis 8 in etwa vergleichbar. Im Anagen IV ist die stärkste Ki67 IR in den Bulbuskeratinozyten zu finden, alle Schichten des proximalen HF sind negativ, in der mittleren ÄWS sind einige Keratinozyten positiv, und seltene KI67 IR findet sich in den distalen Follikelanteilen (Abbildung 4-11 b). Anagen V HF zeigen im distalen HF, dem Isthmus und dem Infundibulum proliferative Aktivität. Der Anteil der Ki67+ Zellen in diesen Regionen ist etwas größer als in der Epidermis. Eine höhere Dichte an Ki67+ Zellen weist die mittlere ÄWS auf und in der Haarmatrix sind alle Keratinozyten bis knapp über die Auber´sche Linie positiv

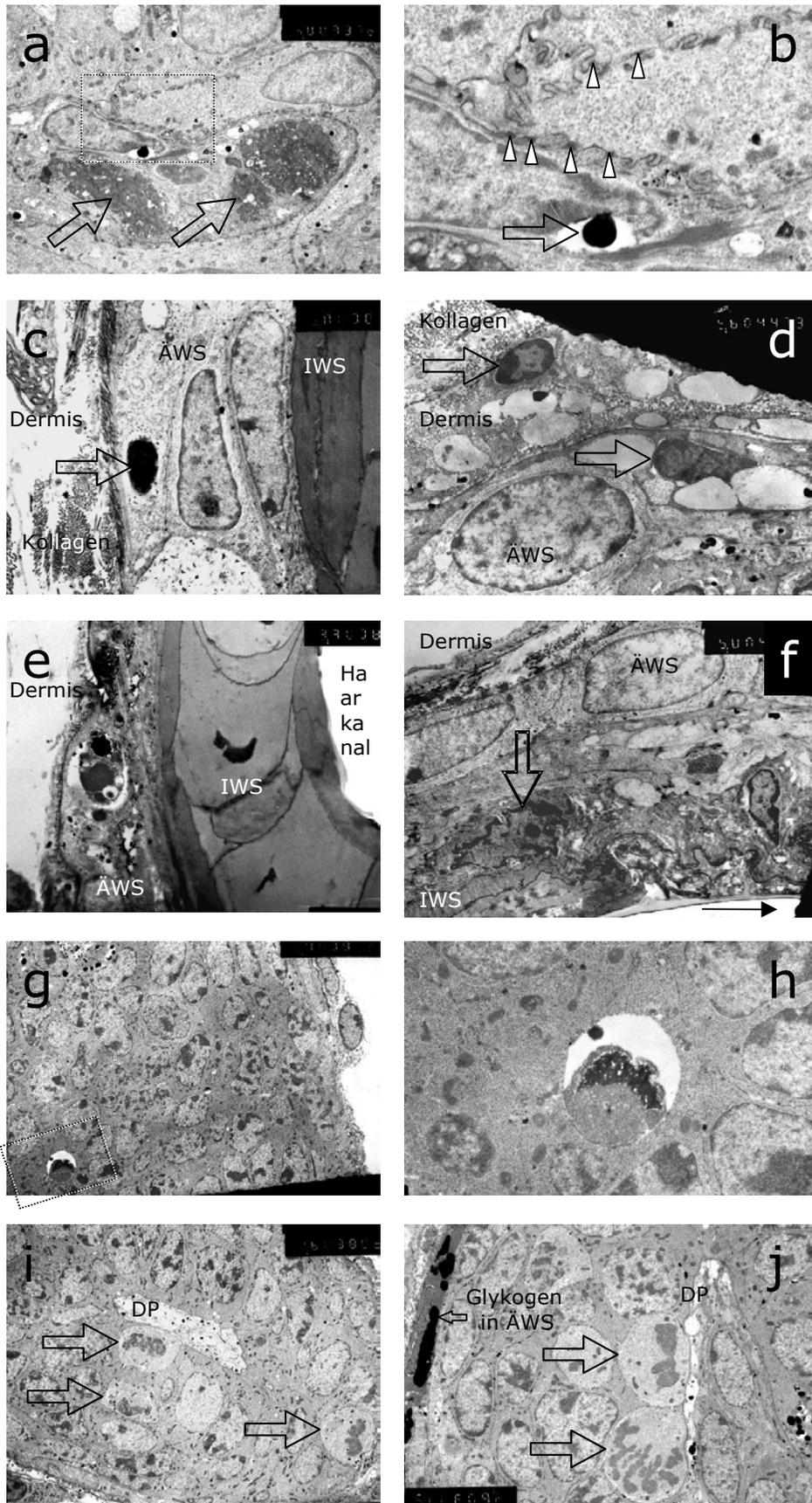
(Abbildung 4-11 d). Diese Verteilung ändert sich im Anagen VI kaum, die höchste Dichte an Ki67+ Zellen ist in der Haarmatrix, proximal davon ist zunächst keine Ki67 IR zu finden. In der mittleren ÄWS liegen einige Ki67+ Zellen, distal davon erst wieder in der distalen ÄWS und dem Infundibulum (Abbildung 4-11 f). Mit dieser Methode war die DP und die BGS durchgängig Ki67-. Mit dem Einsetzen des Katagens und dem Erscheinen der ersten TUNEL+ Zellen in der Haarmatrix ist zunächst kein Rückgang der Ki67 IR zu beobachten. Erst in späteren Katagenstadien, wenn TUNEL+ Zellen reichlich vorhanden sind und die morphologischen Änderungen deutlicher zu Tage treten, nimmt auch die Ki67 IR ab.

Mit dieser Methode wurden in der DP und der BGS keine Ki67+ Zellen im Anagen gefunden. Eine schematische Zusammenfassung der Ki67 IR findet sich in Abbildung 4-16.

## **4.8 Beobachtungen mit der Transmissionselektronenmikroskopie im Anagen**

Die Beobachtungen der TEM bestätigten im Anagen des Haarzyklus die Ergebnisse der TUNEL Methode weitgehend. Apoptotische Zellen fanden sich in allen Phasen des Anagens in den Regionen, in denen auch TUNEL+ Zellen erschienen.

Im Telogen-Anagenübergang sind apoptotische Zellen im epithelialen Strang und im sekundären Haarkeim in der Nähe der Verankerung des Kolbenhaares zu sehen. Abbildung 4-13 a und b zeigt internalisierte Zellreste einer apoptotischen Zelle im sekundären Haarkeim. Die starke Ausprägung der Desmosomen ist im frühen Anagen in den Zellen um das Kolbenhaar oft zu sehen. In späteren Anagenphasen ist Apoptose im mittleren HF nicht häufig, gelegentlich finden sich jedoch apoptotische Zellen oder deren internalisierte Reste in der ÄWS (Abbildung 4-13 c).



**Abbildung 4-13, Transmissionselektronenmikroskopie, Proliferation und Apoptose in verschiedenen Stadien des Anagens**

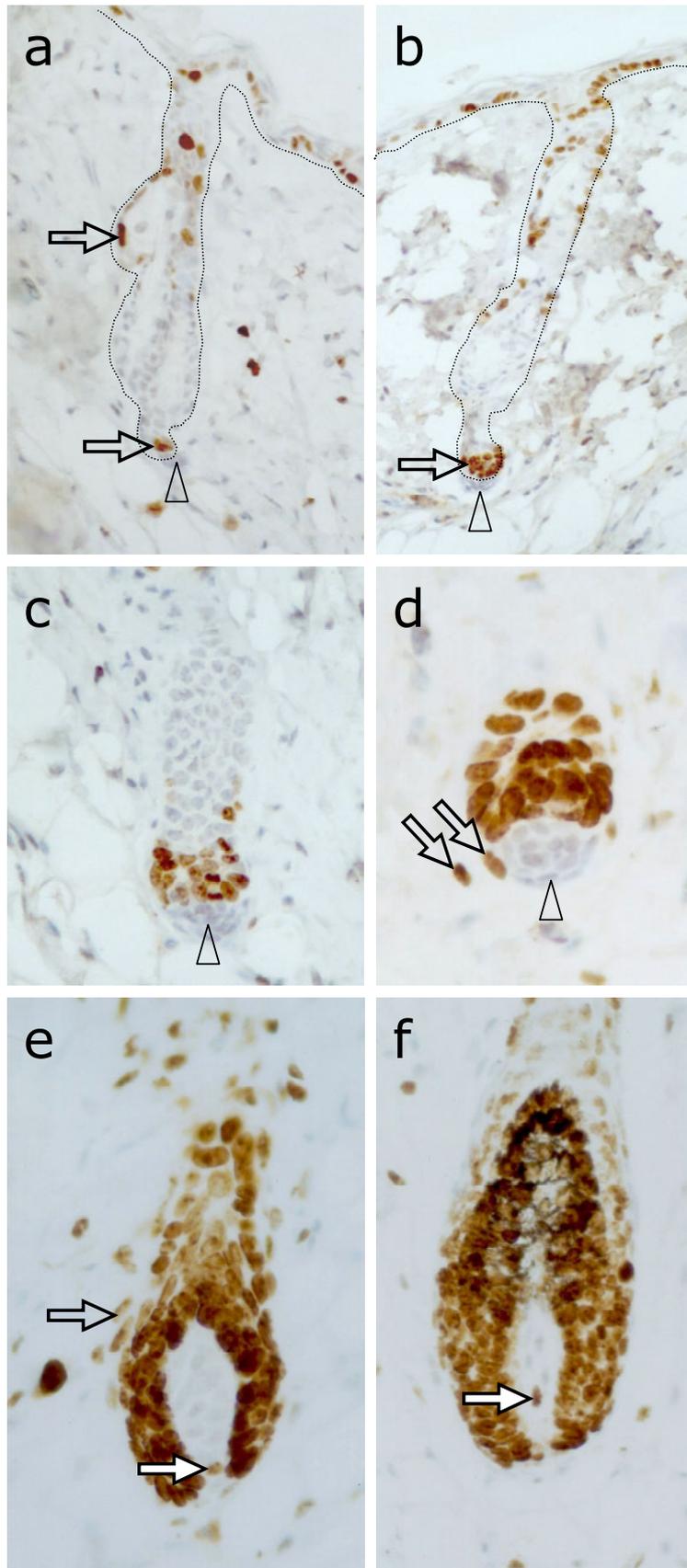
### **Abbildung 4-13, Transmissionselektronenmikroskopie, Proliferation und Apoptose in verschiedenen Stadien des Anagens**

- a) frühes Anagen, internalisierte apoptotische Zellreste (Pfeile) im hair germ (HG), direkt über der Zelle ein apoptotic body
  - b) Ausschnitt aus a), apoptotic body, bestehend aus elektronendichtem nukleärem Material. Die Pfeilspitzen verweisen auf die nach dem Telogen noch vorhandenen stark ausgeprägten und zahlreichen Desmosomen hin
  - c) apoptotic body in einem randständigen Keratinozyten der ÄWS (Pfeil). In der Dermis sind zahlreiche Kollagenfasern zu erkennen
  - d) zwei apoptotische Zellen, die obere befindet sich in der Dermis, die untere in der ÄWS (Pfeile). Beide Zellen befinden sich in einer ähnlichen Phase der Apoptose. Die Zellschrumpfung ist fortgeschritten, die Margination des Chromatins deutlich sichtbar
  - e) fortgeschrittene Apoptose in der ÄWS des distalen Follikel, erkennbar die fortgeschrittene Chromatinkondensation, die Vakuolisierung und die Bildung von apoptotischen Körperchen
  - f) degenerierende Zelle am distalen Ende der IWS. Vor dem Haarkanal endet die IWS und schiebt sich faltig zusammen. An dieser Stelle findet sich eine degenerierende Zelle am ÄWS-IWS-Übergang
  - g) Apoptotischer Keratinozyt im Bulbus eines frühen Katagenfollikels
  - h) Ausschnitt von g), die Zellschrumpfung ist fortgeschritten, die Margination des Chromatins deutlich sichtbar
  - i) Mitosefiguren im Anagen 5-6 in der Haarmatrix (Pfeile)
  - j) Mitosefiguren im Anagen 5-6 in der Haarmatrix nahe der DP, die nach oben migrierenden Keratinozyten der ÄWS enthalten reichlich Glykogen
- 

Ebenfalls selten und ohne regionale Häufung sind apoptotische Zellen in der Dermis. Abbildung 4-13 d zeigt je eine extra- und eine intrafollikulär liegende Zelle in der Höhe des distalen HF. Die in der mittleren und in der distalen IWS beobachteten länglichen TUNEL+ Zellen haben, wie schon in der HF MG beschrieben, ihr TEM Pendant in den langgestreckten Zellen der Henle Schicht. Abbildung 4-13 e zeigt eine apoptotische Zelle in der ÄWS. Im schrägen Schnitt durch die IWS zeigt sich der dunkle Kernschatten der differenzierten IWS Zelle direkt über der Beschriftung (Vgl. auch Abbildung 4-7 h und Abbildung 4-8). Die IWS endet vor dem Infundibulum, sie schiebt sich faltig auf und schilfert in den Haarkanal ab. Am Übergang ÄWS-IWS lassen sich in der ÄWS apoptotische Zellen ausmachen. Manche von ihnen zeigen jedoch nicht die klassische Morphologie apoptotischer Zellen, sondern eher degenerative Merkmale (Abbildung 4-13 f).

Zu Beginn des Katagens erscheinen erste Matrixkeratinozyten TUNEL+, oft noch bevor morphologische Veränderungen auftreten (Abbildung 4-13 g und h), vergleiche auch Abbildung 4-12 g. Mitotische Zellen sind in den späten Anagenphasen verteilt wie in den späten Stadien der HF MG. Vor allem finden sie

sich in der Haarmatrix lateral der DP. In fast jedem Schnitt sind eine oder mehrere mitotische Zellen zu finden (Abbildung 4-13 i, j). Mitotische Zellen in der ÄWS kommen gelegentlich vor. In der DP und der BGS wurden im Zuge dieser Studie keine mitotischen und keine apoptotischen Zellen mit der TEM entdeckt.



**Abbildung 4-14, Ki-67 Antigenfärbung ausgewählter Anagenstadien**

#### **Abbildung 4-14, Ki-67 Antigenfärbung ausgewählter Anagenstadien**

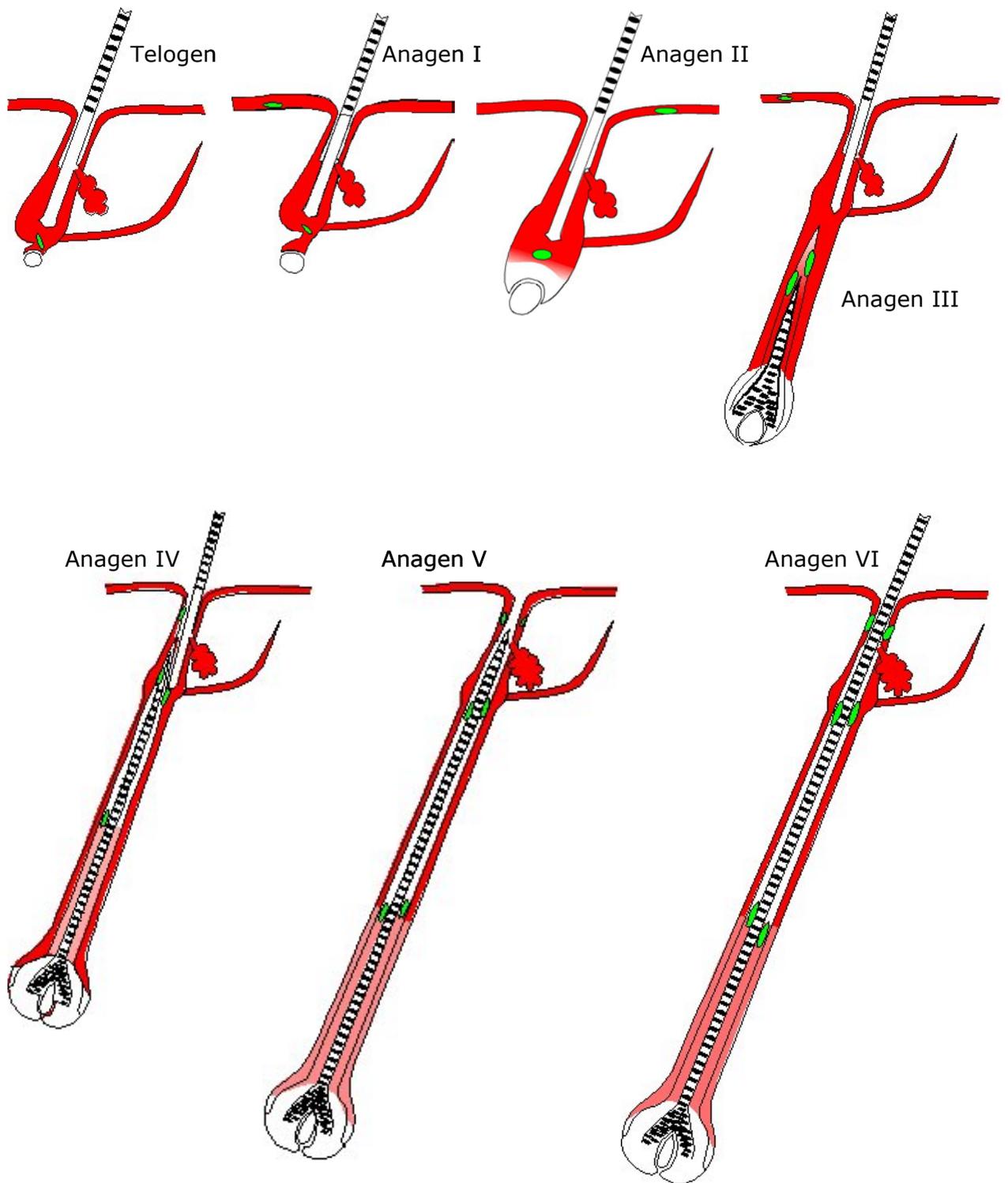
- a) Anagen I, kurz nach dem Austritt aus dem Telogen. Ein, zwei Zellen des ES sind Ki67+ (unterer Pfeil) und sind der erste Hinweis auf das Ende des Telogens. Der distale Follikel enthält weiterhin einige Ki67+ Zellen, ebenso die TD (oberer Pfeil) und die Epidermis. Die DP weist keine IR auf (Pfeilspitze)
  - b) massive Zunahme der Ki67+ Zellen (Pfeil) im Lauf des Anagen I im ES, Zunahme der Ki67+ Zellen in der Epidermis und leichte Zunahme der Ki67+ Zellen im distalen HF. Die DP weist keine IR auf (Pfeilspitze)
  - c) Zunahme der Ki67+ Zellen über der DP (Pfeilspitze) im Anagen II
  - d) Anagen II, Zunahme der Ki67+ Keratinozyten über der DP (Pfeilspitze), einzelne Ki67+ dermalen Fibroblasten (Pfeile) an der DP
  - e) Ki67 IR aller Matrixkeratinozyten im Anagen III HF. Ki67+ Fibroblasten in der CTS und der DP (Pfeile)
  - f) Anagen IV-V HF, einzelne Ki67+ Zelle der DP
- 

## **4.9 Proliferationsassoziierter Marker Ki67 in Gewebe mesenchymaler Herkunft**

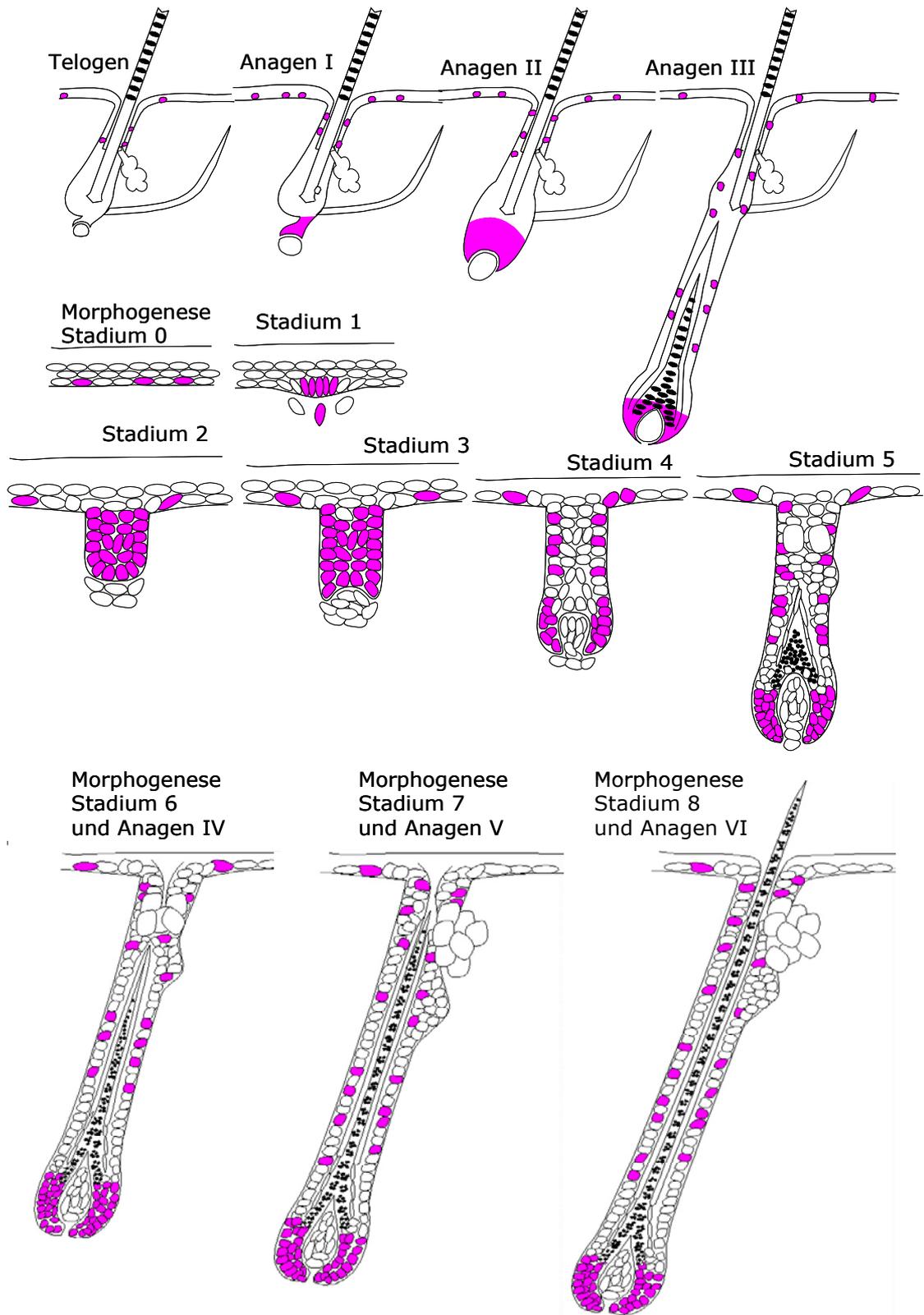
Auch in der Anagenphase wurden die Ergebnisse der Ki67 Fluoreszenzfärbung mit der sensitiveren ABC Methode überprüft. Dies und die dadurch bewerkstelligte bessere Darstellung anatomischer Details führte zu weiteren Ergebnissen, die mit der Fluoreszenzfärbung nicht zu erhalten waren. Die ABC Methode zeigte den proliferationsassozierten Marker Ki67 auch im niedrigproliferativen dermalen Gewebe, das zuvor als Ki67- bewertet worden war.

Im frühen Anagen I zeigt die Ki67 Färbung als erstes Zeichen des Telogen-Anagenübergangs Ki67+ Zellen im epithelialen Strang. Die proliferative Aktivität im restlichen HF ist niedrig und entspricht proximal des Isthmus in etwa der der Epidermis. Ki67+ Zellen finden sich auch in der TD. Vereinzelt Ki67+ Zellen in der Dermis stehen nicht direkt im Zusammenhang mit dem Haarfollikel (Abbildung 4-14 a). Kurz danach nimmt die Zahl der Ki67+ Zellen im epithelialen Strang zu, auch die Aktivität in der Epidermis erhöht sich leicht. Der restliche HF scheint von der Entwicklung nicht betroffen (Abbildung 4-14). Im Anagen II beginnen die Zellen des epithelialen Stranges mit der Bildung des späteren Bulbus und umwachsen die DP (Abbildung 4-14 c). Bis dahin entsprechen die Beobachtungen den Ergebnissen der Ki67 Fluoreszenzfärbung. In Abbildung 4-14 d erkennt man deutlich die im Vergleich zum Anagen I gerundete und bereits vergrößerte DP des Anagen II HF. Zwei Ki67+ Fibroblasten befinden sich in

direkter Nähe zur DP. Die der DP nähere ist Teil der BGS, die den HF umschließt und nur zur DP direkt Kontakt hat. In den späteren Stadien sind Ki67+ dermale Zellen in der BGS und in der DP anzutreffen, wie Abbildung 4-14 e (Anagen III) und Abbildung 4-14 f (Anagen V) beweisen. Beide Bilder zeigen die hohe Sensitivität der Färbung, der Bereich der positiven IR reicht in dieser Färbung distal weit über die Auber'sche Linie hinaus, noch in der proximalen ÄWS sind viele Zellen Ki67+, wenn auch nicht mehr von der hohen Intensität der proximal der Auber'schen Linie gelegenen Matrixkeratinozyten. Auch zeigt diese Färbung eine höhere proliferative Aktivität in der Dermis als die Fluoreszenzfärbung. Diese positiven Signale können nicht ausschließlich Fibroblasten zugeordnet werden, sicherlich sind viele Ki67+ Zellen in der Dermis nicht nur Fibroblasten sondern auch Gefäßendothelzellen. Da der murine HF keine Blutversorgung in der DP aufweist, hat diese Unsicherheit in der Bestimmung des Zelltypus bei den oben beschriebenen Ergebnissen keine Bedeutung.



**Abbildung 4-15, Schematische Zusammenfassung der TUNEL- und ICE-positiven Zellen und Regionen in Telogen und Anagenphase**



**Abbildung 4-16, Schematische Zusammenfassung der fluoreszierenden Ki67-Antikörperreaktion in Morphogenese, Telogen und Anagen**

## 4.10 Der Zelluntergang durch terminale Differenzierung

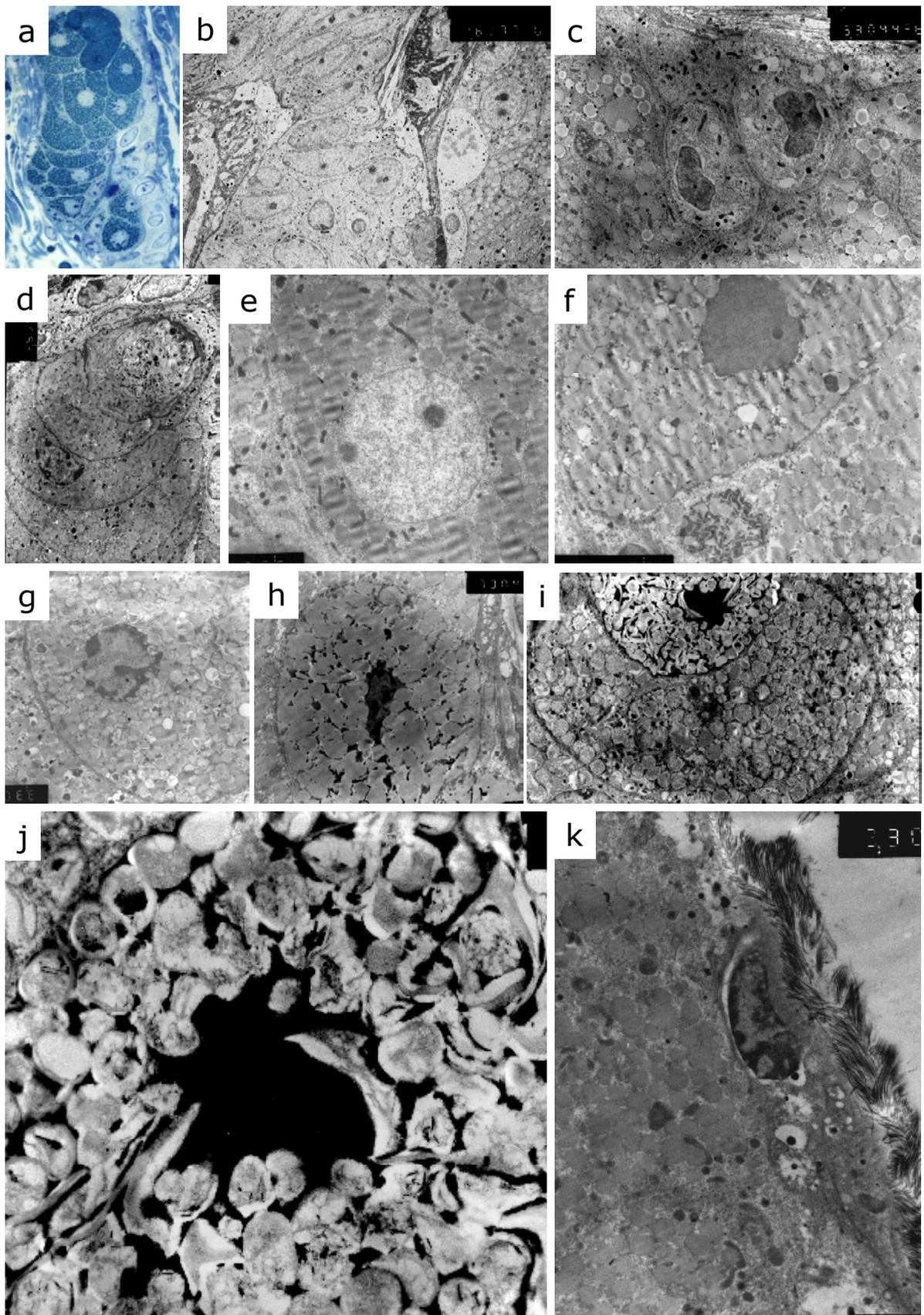
Ähnlich der Apoptose gehen die terminal differenzierenden Zellen des Haarschaftes, der IWS oder der Talgdrüse zum Nutzen des Gesamtorganismus unter. Allerdings schafft ihr Tod keine Lücke, sondern ein Endprodukt. Anhand des Schicksals der Sebozyten ist im folgenden der Weg von der Entstehung der Zellen bis zu ihrem Untergang nachgezeichnet.

Die TD ist eine holokrine, multiazinäre Drüse, deren Entwicklung bei der Maus eng an die Entwicklung der Haare gekoppelt ist. Im Stadium 5 der HF MG differenzieren sich aus HF Keratinozyten die ersten Sebozyten, die erst im Stadium 7 bis 8 deutlich sichtbar die gerade Form des HF durchbrechen und in der Dermis zu liegen kommen. Der gemeinsame Ausführungsgang endet im Haarkanal, die randständigen Zellen des Ausführungsganges gehen in die ÄWS über. Die peripheren Zellen der TD sind der proliferative Pool der TD, aus dem sich ständig Tochterzellen in das Zentrum lösen (Abbildung 4-17 b, c). Die Zellen der peripheren Schicht sind nicht an der Produktion von Lipidtröpfchen beteiligt. Die Tochterzellen beginnen sofort nach der Ablösung von der Mutterzelle mit der Lipidproduktion und werden von den nachrückenden jüngeren Zellen Richtung Ausführungsgang gedrängt. Im Lauf dieser Wanderung nimmt der Umfang der Zellen durch die Lipidproduktion gewaltig zu (Abbildung 4-17 a, d), das Zytoplasma füllt sich mehr und mehr mit den Lipidtröpfchen, dabei bleibt die Kern- und Zellstruktur vorerst noch erhalten (Abbildung 4-17 e). Mit der weiteren Fettproduktion füllt sich der Raum, den vorher das Zytoplasma eingenommen hat, zusehends fast vollständig mit runden Lipidtröpfchen, die ihrer schierem Anzahl wegen beginnen, den Zellkern einzudrücken. Dabei verliert der Zellkern seine normale Struktur, er entrundet sich und das Chromatin erscheint gleichmäßig verdunkelt (Abbildung 4-17 f). Später kondensiert das Chromatin am Rand des Zellkerns, wobei die Produktion von Lipidtröpfchen nicht zu stocken scheint (Abbildung 4-17 g). Schließlich bleibt vom weiter zusammengedrängten Zellkern nur mehr ein elektronendichter Schatten über, dessen Form von den ihn umgebenden Fetttröpfchen bestimmt wird (Abbildung 4-17 h). Die wenigen Lücken, die zwischen den Tröpfchen verbleiben, sind ebenfalls elektronendicht und stellen die im Rest des verbliebenen Zytoplasmas liegenden Zellorganellen dar. Kurz vor dem Erreichen des Ausführungsganges erscheint der bedrängte

Kern im Gegensatz zur massigen Zelle äußerst klein (Abbildung 4-17 i). Er kollabiert unter den andrängenden Fettröpfchen und ergießt seinen Inhalt in das frühere Zytoplasma. Zugleich beginnen die Fettröpfchen zu konfluieren (Abbildung 4-17 j). Kurz darauf geht auch die Zellmembran unter und Fett und Zellschutt vermischen sich zum Sebum.

Einige Beobachtungen im Sterben der Sebozyten erinnert an Apoptose, zum Beispiel die Chromatinmargination, die Zellkernkondensation oder die Funktionsfähigkeit der Zelle bis kurz vor ihr Ende. Andere morphologische Erscheinungen, wie die ständige Vergrößerung der Zelle oder der Integritätsverlust von Zellkern und Zellmembran, sind so eher bei nekrotischen Zellen zu beobachten. Gleichwohl handelt es sich hier sicher um einen programmierten Zelltod, dem nichts akzidentelles anhaftet und der zur Aufrechterhaltung der Funktion der TD unabdingbar ist.

Apoptose mit allen klassischen Anzeichen wurde selten auch in der Talgdrüse gefunden. Sie betraf Zellen des Proliferationpools und war im Katagen zu beobachten. Abbildung 4-17 k zeigt einen apoptotischen peripheren Sebozyten mit der apoptosetypischen Morphologie Margination und Kondensierung des Chromatins, Schrumpfung und Vakuolenbildung und Verlust des Zellkontakts.



**Abbildung 4-17, licht- und elektronenmikroskopische Betrachtung von Proliferation, terminaler Differenzierung und Apoptose in der Talgdrüse**

**Abbildung 4-17, licht- und elektronenmikroskopische Betrachtung von Proliferation, terminaler Differenzierung und Apoptose in der Talgdrüse**

- a) Toluidinblaufärbung, Azinus einer TD. Mit Fettröpfchen gefüllte Zellen, die sich zum Drüsenausgang hin verdichten
- b) transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme (TEM), links der HF, recht die TD. Mitose einer randständigen TD-Zelle aus dem Proliferationspool
- c) TEM, postmitotische Zellen aus dem TD-Proliferationspool
- d) TEM, ähnliche Ansicht wie Abb. a), erkennbar die Verdichtung der Fettröpfchen nach dem Ausführungsgang hin, zuletzt Eischmelzung der Fettröpfchen und der gesamten Zelle in das Sebum
- e) Zelle in der frühen Phase der terminalen Differenzierung. Der Zellkern ist intakt, das Zytoplasma weitgehend mit Fettröpfchen ausgefüllt
- f) beginnende Degeneration der Zelle, Verdichtung des Nukleus und Eindrücken des Nukleus durch die Fettröpfchen
- g) durch Fettröpfchen deformierter Zellkern, Margination des Chromatins
- h) kondensierter und deformierter Nukleus, kurz vor der Zerstörung der Zellkernmembran
- i) die Zellkernmembran ist zerstört, der Inhalt des Zellkerns ergießt sich in die einschmelzenden Fettröpfchen. Kurz danach zerfällt auch die Zellmembran und schmilzt ebenfalls mit ins Sebum ein
- j) Ausschnitt aus i)
- k) apoptotische Zelle des TD-Randes, Margination und Kondensierung des Chromatins, Schrumpfung und Vakuolenbildung

## 5 Diskussion

Die vorliegende Arbeit bestätigt und erweitert die Nachweise früherer Autoren über das Vorhandensein von Apoptose und terminaler Differenzierung in der HF MG und der Anagenphase. Insbesondere werden bisher unerkannt gebliebene Regionen intrafollikulärer Proliferation und Apoptose aufgezeigt und apoptose- und proliferationsassoziierte Parameter im Detail charakterisiert. Erstmals werden diese Parameter stadienbezogen über die gesamte HF MG und die gesamte Anagenphase untersucht und in schematischen Übersichten zusammengefaßt. Die Aussagekraft der mittlerweile zum Standard für Apoptosenachweis gewordenen TUNEL Färbung wird kritisch überprüft. Neben dem Follikelepithel werden auch die Zellpopulationen mesenchymaler Herkunft, die die BGS und die DP bilden, auf Apoptose und Proliferation untersucht und ihre Wachstumskinetik dargestellt.

Der Nachweis von Apoptose ist in allen untersuchten Stadien der HF MG gelungen. Dunkle und degenerierende Zellen, in der HF MG, teilweise phagozytiert, wurden erstmals von Robins (Robins und Breathnach, 1969, TEM) beschrieben, die späterhin als apoptotische Zellen gedeutet wurden (Hashimoto, 1970; Polakowska *et al*, 1994). Alle diese Autoren beschrieben die apoptotischen, bzw. die TUNEL+ Zellen an der Spitze des Haarkonus und im späteren Haarkanal in den Stadien 5-6. In dieser Arbeit zeigte sich, daß dabei unterschieden werden muß zwischen den länglichen TUNEL+ Zellen, die in der IWS des Haarkonus liegen und den rundlichen TUNEL+ Zellen, die lateral oder distal davon liegen. Erstere (Abbildung 4-3 b, c; Abbildung 4-5 e) sind sicher keine Zellen die in klassischer Apoptose untergehen. Vielmehr sind es die Kerne der ausdifferenzierenden Keratinozyten der Henle'schen Schicht (vgl. Abbildung 4-8). Hingegen sind die rundlichen, lateral oder distal vom Haarkonus gelegenen apoptotischen Zellen (Abbildung 4-2 f; Abbildung 4-7 b, d, g) jene Zellen, die vor dem herandrängenden Haarschaft durch Apoptose (oder auch durch Degeneration und anschließender Phagozytose) untergehen und den Weg des Haarschaftes durch das Follikelepithel erleichtern. Die eben beschriebenen apoptotischen Zellen an der und um die Spitze des Haarkonus sind in den Stadien 5 und 6 häufig und lassen sich mit den verschiedenen Methoden leicht überprüfen.

In den frühen Stadien der Morphogenese allerdings wichen die Beobachtungen abhängig von der Methode (TUNEL, HRLM oder TEM) voneinander ab. Warum in den frühen Stadien der HF MG keine TUNEL+ Zellen gefunden wurden, muß dahingestellt bleiben. Die Beobachtungen durch die HRLM jedoch lassen das Vorkommen von Apoptose auch in den frühen Stadien unzweifelhaft erscheinen. In den späteren Stadien der HF MG und im Telogen/Anagen divergierten die Ergebnisse der verschiedenen Methoden nicht und bestätigten einander. Die Abbildung 4-5 a, b, c zeigen die Anzeichen klassischer Apoptose in den Stadien 1 und 3 der HF MG: Kondensation des Chromatin, Schrumpfung und Rundung der Zelle, Kondensation des Zytoplasmas. Erstaunlicherweise liegen manchmal sogar mehrere apoptotische Zellen in enger Nachbarschaft, oft in Regionen, in denen die Proliferationsrate besonders hoch ist. Ähnliche Beobachtungen wurden auch im frühen Anagen gemacht (Abbildung 4-11 g, i), was schließen läßt, daß Apoptose ein Werkzeug der strikten Proliferationskontrolle in sich entwickelnden und in wachsenden Systemen wie der HF MG und des Anagens darstellt.

In den späteren Stadien der HF MG konnten einige Punkte aufgezeigt werden, die regelmäßig TUNEL+ waren: Die mittlere IWS, die distale IWS, die distale ÄWS und das Infundibulum. Die TUNEL+ Zellen der IWS sind ausnahmslos vom länglichen, parallel zum Haarschaft liegenden Typ, die den Kernen der Keratinozyten der Henle Schicht entsprechen. Interessant ist die zweifache Lokalisation der TUNEL Positivität der Henle Keratinozyten: Die erste in der mittleren IWS, was die Differenzierung der Zelle anzeigt. Auf der weiteren Migration distalwärts sind die Henle Keratinozyten wieder TUNEL negativ. Erst kurz vor der Abschilferung in den Haarkanal zeigen diese Zellen erneut TUNEL Reaktivität, die terminale Differenzierung verläuft also in zwei Schritten. Weitere Lokalisationen TUNEL+ Zellen sind die distale ÄWS und das Infundibulum. Dabei befinden sich die TUNEL+ Zellen der distalen ÄWS auf der Höhe der abschilfernden IWS. Abbildung 4-13 f (TEM) zeigt eine degenerierende Zelle am ÄWS-IWS-Übergang am Beispiel eines Anagen HF, einer Lokalisation, die auch gelegentlich TUNEL+ Zellen aufwies. Häufiger jedoch fanden sich TUNEL+ Zellen im Isthmus- und Infundibulumbereich. Einige der Fluoreszenzsignale liegen an der Epithel-Haarkanalgrenze, so daß schwer zu entscheiden ist, ob sie noch dem Epithel zugerechnet werden können, oder ob es sich dabei um Signale handelt, die von abgeschilferten Henle Keratinozyten stammen oder von Kernmaterial, das mit

dem Sebum den Haarkanal erreicht hat. Andere TUNEL+ Zellen sind klar im Epithel des Isthmus-Infundibulumbereiches auszumachen, was durch die TEM bestätigt wurde. Angesichts der Ergebnisse der Ki67 Färbung, daß Teile der ÄWS Ki67+ sind und dem TEM Nachweis mitotischer Zellen in der ÄWS, ist anzunehmen, daß die Apoptose im Bereich der distalen ÄWS eine wichtige Rolle in der Gewebshomöostase des HF spielt, die den ausgewachsenen Follikel trotz nachwachsender ÄWS-Keratinozyten auf konstanter Länge hält.

In keinem Stadium der HF MG wurden TUNEL+ Zellen oder Apoptose durch HRLM/TEM in Zellen der DP oder der BGS entdeckt. Dies verwundert nicht weiter, wurden sogar bei der HF Regression, in der in fast allen Bereichen des HF Epithels eine hohe Dichte an TUNEL+ Zellen gefunden wurde, keine in der DP und der BGS detektiert (Lindner *et al*, 1997). Die BGS verliert nach einer Verkleinerung des gesamten HF um 2/3 seiner Länge nicht an Masse, vielmehr wirft sie sich faltig auf und nimmt an Dicke zu. Es ist zu vermuten, daß sich BGS und DP ihrer überflüssigen Zellen in der Regressions- und der anschließenden Ruhephase durch Migration derselben in die Dermis entledigen.

Nach der Bereinigung der mißverständlichen Begriffsvielfalt, die in der Stadieneinteilung Verwirrung schafft, zeigt die Tabelle 5-1, daß die Lokalisationen der TUNEL+ Zellen in der humanen HF MG (soweit sie untersucht wurden) und der murinen HF MG durchaus vergleichbar sind. Nur im Stratum basale weichen die Beobachtungen voneinander ab; die Abweichung in den Stadien 1-3 beruht auf der Verwendung unterschiedlicher Methoden. Diese weitgehende Vergleichbarkeit bestätigt das Standardmodell der Haarforschung, die C57BL/6-Maus in der Haarfollikelmorphogenese in Bezug auf das Vorkommen und die Lokalisation der Apoptose.

	Humane Haarfollikelmorphogenese (Polakowska <i>et al</i> , 1994)			Murine Haarfollikelmorphogenese (vorliegende Arbeit)		
	Stadium	Lokalisat.	Häufigkeit	Stadium	Lokalisat.	Häufigkeit
<b>Epidermis</b>	alle	Stratum basale	-		Stratum basale	+ (einzeln)
	alle	höhere Schichten	+		höhere Schichten	+
<b>Haarfollikel</b>	Keim		-	1-3	Keratino- zyten	(nur HRLM +)
	Zapfen	Haar- konus	+	4-5	Haar- konus	+
	Follikel	Haar- konus / Haarkanal	+	6-7	Haar- konus / mittlere IWS	+
		Bulbus	Nicht getestet	8, Übergang zum Katagen	Bulbus	+

**Tabelle 5-1, Vergleich der TUNEL+ in der humanen und der murinen Haarfollikelgenese**

Die frühen Stadien des Anagens sind nur sehr eingeschränkt mit denen der HF MG vergleichbar, wohingegen zwischen den Anagenphasen IV-VI und den Stadien 6-8 sehr wohl Parallelen gezogen werden können. Dabei wurde dem Telogen bisher wenig Aufmerksamkeit gewidmet. In dieser Arbeit wurden vereinzelt TUNEL+ Markierungen im Telogen HF beobachtet, an den unterschiedlichsten Lokalisationen, wie dem epithelialen Strang, dem sekundären Haarkeim und in Zellen um das Kolbenhaar. Da der Telogenfollikel für einen Ersatz apoptotisch abgebauter Zellen keine genügende proliferative Aktivität aufweist, darüberhinaus die fluoreszierenden Signale besonders klein sind und die Lokalisation der TUNEL+ Zellen sehr streut, handelt es sich hier vermutlich um die Reste apoptotischer Körperchen aus dem vergangenen Katagen, die im stoffwechselreduzierten Telogenfollikel noch nicht restlos abgebaut sind. Die typische Lokalisation apoptotischer Zellen im Anagen I ist der epitheliale Strang, im Anagen II der um die DP wachsende Bulbus, in oder knapp distal der Zellen mit der höchsten proliferativen Aktivität. Dieses enge Zusammentreffen von Proliferation und Zelltod wurde auch in den Stadien 1-3 der HF MG gefunden. Apoptose wurde auch im sekundären Haarkeim beobachtet (Abbildung 4-13 a). Ähnlich der im Stadium 5-6 der HF MG gefundenen länglichen TUNEL+ Zellen an

der Spitze des Haarkonus, finden sich im Anagen III und IV TUNEL+ Zellen gleicher Form an der selben Stelle. Bei Anagen VI HF TUNEL+ waren: Die mittlere IWS, die distale IWS, die distale ÄWS und das Infundibulum. Damit entspricht die Verteilung der TUNEL+ Zellen der der HF MG im Stadium 8, und die an der Stelle gezogenen Schlüsse gelten auch für den reifen Anagen VI HF. Auch die Beobachtungen der TEM im Anagen weichen nicht von denen der HF MG ab. Die hier gemachten Beobachtungen widersprechen in Teilen den Ergebnissen von Tamada und Soma (Tamada *et al*, 1994; Soma *et al*, 1998) am adulten humanen Haarfollikel. Beide untersuchten am humanen Anagen VI HF Apoptose mit der TUNEL Methode. Tamada fand TUNEL+ Zellen in allen Schichten der IWS, jeweils auf Höhe ihrer Keratinisierungszone. Soma richtete sein Augenmerk nur auf den proximalen Teil des HF, wo er in der keratogenen Zone zahlreiche TUNEL+ Zellen in der gesamten IWS und den Haarkortezellen fand. Dabei werden die Begriffe TUNEL+, Apoptose und terminale Differenzierung unterschiedslos angewandt. Mit Sicherheit handelt es sich bei den TUNEL+ Zellen dieser Schichten nicht um klassische Apoptose, vielmehr um terminale Differenzierung. Die meisten Zellen der keratogenen Zone, mit Ausnahme der Kerne der Henle Schicht, wurden in den Versuchen der vorliegenden Arbeit nicht durch die TUNEL Methode angefärbt. Lediglich Zellen der Medulla zeigten gelegentlich auf Höhe ihrer Differenzierung ein schwaches Signal. Möglicherweise liegt dies an der höheren Sensitivität (biotinyliertes Deoxyuridin und Koppelung mit Peroxidasekonjugiertem Streptavidin) seiner Methode. Diese unterschiedliche Beurteilung der TUNEL Methode wirft die Frage auf, inwieweit die TUNEL Färbung als Marker für Apoptose von Bedeutung ist. Ohne Zweifel erleichtert sie, vor allem in der Kombination mit der Hoechst 33342 Färbung, das Auffinden apoptotischer Zellen ungemein. Doch mehrere Autoren warnen vor der unkritischen Anwendung der Methode und der Interpretation durch TUNEL erhaltenen Daten (Ansari *et al*, 1993; Negoescu *et al*, 1996; Kimura *et al*, 1997; Labat Moleur *et al*, 1998) und beschreiben Fehlerquellen, die sowohl auf suboptimale Färbetechniken als auch auf die Anfärbung nicht-apoptotischer Zellen zurückzuführen sind.

	Humanes Anagen Soma (Soma <i>et al</i> , 1998)			Murines Anagen (vorliegende Arbeit)		
	Stadium	Lokalisat.	Häufigkeit	Stadium	Lokalisat.	Häufigkeit
<b>Epidermis</b>	alle	Stratum basale	-		Stratum basale	+ (einzeln)
	alle	höhere Schichten	-		höhere Schichten	+ (einzeln)
<b>Haarfollikel</b>	Anagen I-II	nicht getestet			epithelialer Strang, sek. Haarkeim	+
	Anagen III-IV	nicht getestet		Anagen III-IV	Haarkonus	+
	Anagen V-VI	Henle, Huxley, Cuticula, Cortex	+ + + ++	Anagen V-VI	mittlere/ distale IWS (Henle) distale ÄWS (Isthmus/ Infundibulum)	+ + +

**Tabelle 5-2, Vergleich der TUNEL+Zellpopulationen in humanen und murinen Anagen Haarfollikeln**

Während sich Fehler in der Gewebsverarbeitung und der Färbetechnik als verringerte oder erhöhte Sensitivität, oder gar als inverse Anfärbung auswirken, ist die regelmäßige Anfärbung nekrotischer Zellen kaum zu verhindern und muß durch aufmerksame morphologische Begutachtung von der Bewertung als apoptotische Zelle ausgeschlossen werden. Auch die Anfärbung von differenzierenden Keratinozyten wurde beobachtet (Mitra *et al*, 1997; Gandarillas *et al*, 1999). Daher empfehlen viele Autoren die Überprüfung der durch die TUNEL Methode erhaltenen Daten durch eine andere Methode, z. B. Licht- oder Elektronenmikroskopie. Die Spezifität der hier zusätzlich angewandten Hoechst 33343 Färbung ist als alleinige Kontrolle zu gering. Wieviel Apoptose und terminale Differenzierung in der Haut gemeinsam haben und ob Teile ihres Ablaufes identisch sind, ist umstritten (Maruoka *et al*, 1997; Gandarillas *et al*, 1999; Gandarillas, 2000). Unbestrittene Gemeinsamkeiten von Apoptose und terminaler Differenzierung sind z. B. die Herunterregulierung von bcl-2 oder die vermehrte Expression von Transglutaminasen (Polakowska *et al*, 1994; Gandarillas *et al*, 1999; Melino *et al*, 2000). Hinsichtlich ihres Endproduktes unterscheiden sich die beiden Vorgänge sehr wohl: Das Stratum corneum der Epidermis, der Haarschaft oder das Sebum der Talgdrüsen sind die sichtbaren Ergebnisse terminaler Differenzierung. Anhand der Talgdrüsen ist der Ablauf der

terminalen Differenzierung von Sebozyten in Kapitel 4.10 nachgezeichnet. Dabei finden sich morphologisch Anhaltspunkte, die sowohl für Apoptose als auch für Nekrose typisch sind. Andeutungsweise wird in den Nuklei von Sebozyten fortgeschrittenen Stadiums Margination von Chromatin sichtbar, der Zellkern schrumpft und das Chromatin kondensiert. Die Zellen bleiben bis kurz vor ihrem Ende produktiv und halten den Zell-Zell-Kontakt. Andererseits schwillt die Zelle durch die Produktion der Lipidtröpfchen an, der Nukleus verliert seine Integrität und ergießt sich in das Zytoplasma, die Zellmembran rupturiert und der gesamte Inhalt konfluiert mit dem der vorhergegangenen Zellen zu Sebum. Zweifelsohne ist der Zelltod der Sebozyten programmiert, und der Verlust der Zellintegrität geht nicht mit Entzündungszeichen einher. Es handelt sich also trotz mancher Ähnlichkeit nicht um Nekrose. Ebenfalls sind die Parallelen zur Morphologie der Apoptose zu rar, als daß es sich um Apoptose in klassischem Sinne handeln könnte. TUNEL+ Signale sind in der Talgdrüse auf Höhe des Ausführungsganges gelegentlich zu erkennen, aber nicht in dem Maße, daß alles Kernmaterial angefärbt würde.

Nichtsdestotrotz kann es in der Talgdrüse auch zu Apoptose kommen. Abbildung 4-17 zeigt eine apoptotische Zelle der peripheren Schicht der Talgdrüse. Vermutlich kommt es im Zuge des beginnenden Katagens zur apoptotischen Deletion von Sebozyten.

Frühere Untersuchungen der Proliferation in der HF MG mußten sich auf das Auffinden mitotischer Zellen oder auf Marker, die nur einen Teil des Zellzyklus abdecken, beschränken. Die Problematik dieser Vorgehensweise und die Vorteile der Ki67 IR sind in Kapitel 1.2 beschrieben.

Ohne Zweifel ist die Entstehung des HF einer noch wenig verstandenen Interaktion epithelialer und mesenchymaler Zellen zu verdanken. Diskutiert werden eine Reihe von Homeobox Genen, Transkriptionsfaktoren und Signal- und Adhäsionsmolekülen (Müller-Röver und Paus, 1998; Philpott und Paus, 1998a; Botchkarev *et al*, 1999). Dabei wird vermutet, daß das ursprüngliche Signal aus dem Mesenchym herrührt. Die morphologischen Beobachtungen diesbezüglich widersprechen einander und in Teilen der Theorie der mesenchymalen Induktion. Danneel (Danneel, 1931) bestreitet jede Mitwirkung dermalen Zellen in den frühen Phasen, Pinkus (Pinkus, 1958) hingegen sieht lediglich die Pelage HF und alle menschlichen HF rein epidermalen Ursprungs an, während Vibrissae eine

mesenchymale Vorstufe aufweisen. Aus morphologischer Sicht konnten in dieser Arbeit weder die eine noch die andere Beobachtung verifiziert werden. Vielmehr scheint das Auftreten epithelialer und mesenchymaler Veränderungen zur gleichen Zeit zu erfolgen, oder in so schneller Abfolge, daß es zumindest so scheint. Frühere Autoren geben zu, daß es sehr schwer ist, das frühe Stadium 1 der HF MG auszumachen (Danneel, 1931; Fleischhauer, 1953; Pinkus, 1958). Zum einen sind die frühen Veränderungen des Stratum basale des Epithels sehr diskret, zum anderen ist die fetale Dermis ausgesprochen zellreich, so daß eine Aggregation von Zellen darin schwer zu beurteilen ist. Dank der Ki67 IR konnten das Stadium 1 der HF MG schnell ausgemacht werden. Es zeigte sich, vor allem in der sensitiveren ABC Methode, daß sowohl Zellen des Epithels als auch des Mesenchyms dieses Stadiums in den Zellzyklus eingetreten waren und beide morphologische Veränderungen aufwiesen. Die Zellen des Haarkeims waren alle Ki67+, vergrößert und aufgerichtet und wölbten sich leicht in die Dermis vor. Die mesenchymalen Zellen waren unter dem Haarkeim zum Teil Ki67+ und zeigten eine leichte Aggregation. Beim Vordringen des Haarfollikels in die Dermis wird in manchen Publikationen von Invagination gesprochen (Fleischhauer, 1953; Chase, 1954). Dies trifft nur, und nicht ausschließlich, auf das Stadium 1 zu. Elemente der Invagination, wie Polarisierung der Zellen und Proliferation in der umliegenden Epidermis sind zu beobachten, doch die hohe Dichte an Ki67+ Zellen im Haarkeim weist dieses Vordringen als proliferationsabhängig aus. Ab dem Stadium 2 verlieren sich die Hinweise auf Invagination, der HF wächst allein durch seine eigene proliferative Aktivität in die Tiefe, bis zum Stadium 3 sind fast alle Keratinozyten des HF Ki67+. In den späten Stadien hat sich die Ki67 IR auf bestimmte Regionen im HF zurückgezogen: Die Matrixkeratinozyten, vor allem unterhalb der Auber'schen Linie, die mittlere ÄWS und die Isthmus-/Infundibulum Region. Dabei entstehen interessante Lücken der Ki67 IR zwischen dem Bulbus und der mittleren ÄWS, und zwischen der mittleren ÄWS und deren distalen Anteilen. In der vorhergehenden Besprechung der TUNEL Ergebnisse wurde dieses Phänomen bereit angedeutet. Es weist darauf hin, daß auch im ausgewachsenen HF nicht nur die Matrixkeratinozyten, die später die IWS, die Cuticulae und den Haarschaft bilden, sondern auch, wenn auch in geringerem Umfang, die Zellen der ÄWS Richtung Epidermis wandern. Dabei könnte dieses Muster zweierlei bedeuten: 1) Die Zellen nehmen ihren Ursprung in der Matrix des Bulbus und migrieren langsam distalwärts. Dabei gelangen sie in die

Ruhephase und schaffen die Ki67- Lücke in der proximalen ÄWS. Auf Höhe der mittleren ÄWS treten sie wieder in den Zellzyklus ein (Ki67+), den sie in der auf der weiteren Migration wieder verlassen. Letztmalig im Isthmus-/Infundibulumbereich werden sie wieder Ki67+. Die überschüssigen Zellen werden dort über Apoptose deletiert. 2) Die ÄWS Keratinozyten der proximalen ÄWS sind stabil. Eine Region der mittleren ÄWS produziert weitere Keratinozyten. Nur diese Zellen wandern distalwärts und werden dort per Apoptose entfernt. Unterstützt werden beide Theorien durch die Beobachtung, wenn auch seltener Mitosefiguren in der mittleren ÄWS und dem Nachweis von Apoptose in der infundibulären ÄWS.

Ki67 IR in der DP und der BGS wurden mit der Immunfluoreszenz kaum gefunden. Die Ki67 ABC Methode zeigt Ki67+ Zellen in den zum HF gehörenden Fibroblasten über alle Stadien hinweg. Die proliferative Aktivität in den mesenchymalen Zellen ist um ein Vielfaches geringer als in den epithelialen Anteilen des HF. Abbildung 4-9 zeigt Mitosefiguren und Ki67 IR in verschiedenen Stadien der HF MG. Dabei zeigt sich in den unter dem Haarkeim im Stadium 1 liegenden Fibroblasten bereits Ki67 IR und auch mitotische Zellen. Die schließen sich bald zur BGS zusammen und umfassen den Haarzapfen. In den Stadien 2 bis 4 finden sich proliferierende Zellen vor allem lateral des HF in der BGS, seltener am Rand der DP. Erst ab dem Stadium 4 kommen auch proliferierende Zellen in der mittlerweile vom Bulbus umschlossenen DP vor. Diese Ergebnisse zeigen, daß sowohl Proliferation der DP Fibroblasten als auch Migration aus der BGS an der Bildung der DP beteiligt sind. Dabei ist im Stadium 1, wenn noch keine BGS vorhanden ist, und in den Stadien 4-8, wenn die DP fast vollständig von den Keratinozyten des Bulbus umschlossen ist, vor allem Proliferation an der Bildung der DP beteiligt. In den Stadien dazwischen scheint die Migration aus der BGS die größere Rolle zu spielen.

Untersuchungen von Bullough (Bullough und Laurence, 1958) über die mitotische Aktivität (colchicinarretiert) während des Telogen-Anagen-Übergangs und der Anagenphase an murinen HF waren die erste umfassende Untersuchung über Proliferation über das gesamte Anagen. Diese Arbeit bestätigt die Ergebnisse weitgehend, ergänzt jedoch die bisher bekannten Lokalisationen hoher proliferativer Aktivität im reifen Anagenfollikel.

Im Telogen ist der Follikel proximal des Isthmus ohne Hinweis auf Proliferation. Nur in den distal des Isthmus gelegenen Regionen sind Ki67+ Zellen

nachweisbar. Im Anagen I beginnen die Keratinozyten im epithelialen Strang, vor allem im proximalen Anteil, stark zu proliferieren. Im Anagen II umwachsen sie die DP bereits zum Teil, sie sind weiterhin stark Ki67+. Die Bereiche distal davon sind kaum aktiv. Im Anagen III sind die Matrixkeratinozyten stark Ki67+, ebenso wie einzelne Zellen der mittleren ÄWS und der distalen ÄWS. In Anagen IV bis Anagen VI ist die Ki67 IR ähnlich verteilt, wie in den Stadien 6 bis 8 der HF MG: Die Matrixkeratinozyten, vor allem unterhalb der Auber'schen Linie, die mittlere ÄWS und die Isthmus/Infundibulum Region. Dabei entstehen wieder die oben beschriebenen Lücken der Ki67 IR. Bullough beschreibt ebenfalls diese Proliferationslücken in der ÄWS im Anagen III – IV, in den späteren Stadien konnte er sie nicht mehr beobachten. In Anagen VI HF ist dieses Verteilungsmuster in anti-PCNA und Ki67 Färbungen entdeckt worden (Miyachi *et al*, 1990; Soma *et al*, 1998). Allerdings gehen die Autoren nicht weiter auf diese Verteilung ein.

Vergleichbar der HF MG konnte bei mesenchymalen HF Zellen keine Ki67 IR durch Fluoreszenzmarkierung entdeckt werden. Auch hier zeigte sich erst durch die Ki67 ABC Methode, daß die Fibroblasten sehr wohl proliferieren. Es zeigte sich, daß ab dem Anagen II einzelne BGS Fibroblaste proliferieren, häufig am Übergang zur DP. Ab dem Anagen III sind sind Ki67+ Zellen auch in der DP zu beobachten. Im reifen Anagenfollikel wurden keine Ki67 Zellen in der DP beobachtet. Insgesamt ist die Zahl der Ki67+ BGS und DP Zellen im Anagen geringer als in der HF MG. Das mag zum einen daran liegen, daß der Anagen HF vergleichsweise weniger Masse und Länge aufzubauen hat, zum anderen, daß die BGS bereits vorhanden und sehr dick ist und daß die DP Zellen bereits aggregiert sind und die Größenzunahme der DP im Lauf des Anagens geringer ist als in der HF MG.

Die Visualisierung der IR von Caspase-1 (ICE) entsprach nicht den Erwartungen als apoptoseassoziiertes Marker. Sowohl in der HF MG als auch in der Anagenphase war eine positive Korrelation zwischen TUNEL+ und ICE IR nur andeutungsweise zu erkennen. TUNEL+ Zellen und Apoptose traten zwar in der Mehrzahl in ICE+ Regionen auf, doch wurden auch in ICE- Kompartimenten TUNEL+ Zellen und Apoptose gefunden (z.B. der epitheliale Strang im Anagen I). In Zellverbänden, die nie ICE IR aufwiesen, wurden auch keine TUNEL+ gefunden. Dies trifft auf die DP und die BGS zu. Deutlicher war die negative

Korrelation zur Ki67 IR. Abgesehen von den frühen Stadien der HF MG, in der Ki67 IR und ICE IR nahezu deckungsgleich waren, war zu beobachten, daß sich die ICE IR in den Regionen zunehmender proliferativer Aktivität abschwächt und dann ganz zum Erliegen kommt. In den Abbildung 4-2 c, d und Abbildung 4-11 h, i, j wird diese negative Korrelation deutlich.

Mit dieser Arbeit wird erstmals eine umfassende und stadienbezogene Untersuchung über programmierten Zelltod und Proliferation am C57BL/6 Mausmodell vorgenommen. Die Zusammenfassung der Ergebnisse in den schematischen Übersichtszeichnungen erlaubt einen schnellen und sicheren Vergleich von zukünftigen Versuchen mit der hier präsentierten physiologischen Kontrolle. Damit können HF von pathologischem Gewebe auf Abweichungen der Apoptose und Proliferation hin untersucht werden (z. B. Alopecia areata, Alopecia androgenetica, Pseudopelade Brocq, toxische Alopezien).

Das Mausmodell C57BL/6 hat sich in dieser Studie in Bezug auf programmierten Zelltod und Proliferation als gutes Modell der humanen HF MG und der Anagenphase erwiesen, soweit über humane HF Wachstumsphasen umfassende Daten vorlagen. Die Ergebnisse der proliferativen Aktivität sind ohne weiteres übertragbar. Die Differenzen zwischen der humanen und murinen HF Entwicklung in der TUNEL Färbung können zum guten Teil den Tücken der TUNEL Technik angelastet werden, wie die Kontrolle durch HRLM und TEM und die konsequente Trennung der Begriffe Apoptose und terminale Differenzierung zeigte.

## 6 Zusammenfassung

Die Koordination der Zunahme an Zellen (Proliferation) und deren programmierter Untergang (Apoptose) hat entscheidende Bedeutung für die Entwicklung und das Wachstum von Organen, ist aber bisher weitgehend unverstanden. In dieser Arbeit werden deshalb das Auftreten von Apoptose und Proliferation während der Entwicklung (Morphogenese) und des Wachstums des Haarfollikels (Anagen) untersucht. Der Haarfollikel ist hierfür als Modellorgan besonders gut geeignet, da dessen Stadien der Organogenese und des Anagens histologisch im Detail untersucht sind.

Die vorliegende Arbeit zeigt, daß Proliferation das Leitmerkmal der Morphogenese und des Anagens darstellt. In Abhängigkeit des Entwicklungsstadiums des Follikels sind charakteristische Schwerpunkte der Proliferation in Keratinozyten und Zellen mesenchymaler Herkunft identifizierbar. Haarfollikelmorphogenese und Anagen sind sich dabei in den späten Entwicklungsstadien sehr ähnlich.

Darüberhinaus zeigen unsere Untersuchungen erstmals, daß in allen Stadien der Haarfollikelmorphogenese und Anagens, insbesondere in den frühen Phasen und in Regionen mit hoher Proliferationsrate, Apoptose stattfindet. Das läßt schließen, daß Apoptose als Regulativ der Proliferation an der Organformung beteiligt ist. In den späteren Stadien findet sich Apoptose vor allem im Epithel des Haarkanals wo sie zur Gewebshomöostase beiträgt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen erstmals, daß Proliferation und Apoptose beim wachsenden Haarfollikel 1) präzise aufeinander abgestimmt, 2) in spezifischen Arealen und 3) zu genau definierten Zeitpunkten auftreten. Dies legt nahe, daß die streng kontrollierte Interaktion von Proliferation und Apoptose für die normale Entwicklung und das Wachstum von Organen, hier speziell des Haarfollikels, notwendig ist. Auf der Basis dieser Beobachtungen lassen sich nun 1) gezielte funktionelle Untersuchungen anschließen und 2) das Zusammenspiel von Proliferation und Apoptose bei krankhaften Prozessen in der Entwicklung und während des Wachstums von Organen vergleichend charakterisieren.

## 7 Literatur

Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J: Human ICE/CED-3 protease nomenclature [letter]. *Cell* 87: 171, 1996

Ansari B, Coates PJ, Greenstein BD, Hall PA: In situ end-labelling detects DNA strand breaks in apoptosis and other physiological and pathological states. *J Pathol* 170: 1-8, 1993

Arch RH, Gedrich RW, Thompson CB: Translocation of TRAF proteins regulates apoptotic threshold of cells. *Biochem Biophys Res Commun* 272: 936-945, 2000

Baker SJ and Reddy EP: Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. *Oncogene* 17: 3261-3270, 1998

Bellamy CO, Malcomson RD, Harrison DJ, Wyllie AH: Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis. *Semin Cancer Biol* 6: 3-16, 1995

Bertin J, Mendrysa SM, LaCount DJ, Gaur S, Krebs JF, Armstrong RC, Tomaselli KJ, Friesen PD: Apoptotic suppression by baculovirus P35 involves cleavage by and inhibition of a virus-induced CED-3/ICE-like protease. *J Virol* 70: 6251-6259, 1996

Bhat RV, DiRocco R, Marcy VR, Flood DG, Zhu Y, Dobrzanski P, Siman R, Scott R, Contreras PC, Miller M: Increased expression of IL-1beta converting enzyme in hippocampus after ischemia: selective localization in microglia. *J Neurosci* 16: 4146-4154, 1996

Bodey B, Bodey B, Jr., Groger AM, Siegel SE, Kaiser HE: Clinical and prognostic significance of Ki-67 and proliferating cell nuclear antigen expression in childhood primitive neuroectodermal brain tumors. *Anticancer Res* 17: 189-196, 1997

Botchkarev VA, Botchkareva NV, Roth W, Nakamura M, Chen LH, Herzog W, Lindner G, McMahon JA, Peters C, Lauster R, McMahon AP, Paus R: Noggin is a mesenchymally derived stimulator of hair-follicle induction. *Nat Cell Biol* 1: 158-164, 1999

Bullough WS and Laurence EB: The Mitotic Activity of the Follicle. In: (eds.) W. Montagna and R. A. Ellis: *The biology of the hair growth.* , Academic Press, New York, 1958

Camacho F and Montagna W: Tricología. Enfermedades del folículo pilosebáceo. Madrid, Grupo Aula Médica, 1996

Casciola-Rosen L, Nicholson DW, Chong T, Rowan KR, Thornberry NA, Miller DK, Rosen A: Apopain/CPP32 cleaves proteins that are essential for cellular repair: a fundamental principle of apoptotic death. *J Exp Med* 183: 1957-1964, 1996

Cece R, Cazzaniga S, Morelli D, Sfondrini L, Bignotto M, Menard S, Colnaghi MI, Balsari A: Apoptosis of hair follicle cells during doxorubicin-induced alopecia in rats. *Lab Invest* 75: 601-609, 1996

Ceretti DP, Kozlosky CJ, Mosley B, et al. e: Molecular cloning of the interleukin 1beta converting enzyme. *Science* 256: 97-100, 1992

Chainy GB, Manna SK, Chaturvedi MM, Aggarwal BB: Anethole blocks both early and late cellular responses transduced by tumor necrosis factor: effect on NF-kappaB, AP-1, JNK, MAPKK and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 272: 144-150, 2000

Chang HY, Nishitoh H, Yang X, Ichijo H, Baltimore D: Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by the adapter protein Daxx. *Science* 281: 1860-1863, 1998

Chase H: The growth of hair. *Physiol Rev* 113-156, 1954

Chauhan D, Pandey P, Ogata A, Teoh G, Treon S, Urashima M, Kharbanda S, Anderson KC: Dexamethasone induces apoptosis of multiple myeloma cells in a JNK/SAP kinase independent mechanism. *J Biol Chem* 272: 24731-24734, 1997

Chen YR, Wang W, Kong AN, Tan TH: Molecular mechanisms of c-Jun N-terminal kinase-mediated apoptosis induced by anticarcinogenic isothiocyanates. *J Biol Chem* 273: 1769-1775, 1998

Chinnaiyan AM, K OR, Lane BR, Dixit VM: Interaction of CED-4 with CED-3 and CED-9: a molecular framework for cell death. *Science* 275: 1122-1126, 1997

Cotsarelis G, Sun TT, Lavker RM: Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. *Cell* 61: 1329-1337, 1990

Cotter SJ and Martin TG: Techniques in Apoptosis. Oxford, Oxford University Press,, 1996

Crissman HA and Steinkamp JA: Cell cycle-related changes in chromatin structure detected by flow cytometry using multiple DNA fluorochromes. *Eur J Histochem* 37: 129-138, 1993

Cryns VL, Bergeron L, Zhu H, Li H, Yuan J: Specific cleavage of alpha-fodrin during Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis is mediated by an interleukin-1beta-converting enzyme/Ced-3 protease distinct from the poly(ADP-ribose) polymerase protease. *J Biol Chem* 271: 31277-31282, 1996

Danneel R: Die Entwicklung der Haare bei der Ratte. *Z Morph Ökol Tiere* 20: 733-754, 1931

Davidson P and Hardy MH: The development of mouse vibrissae in vivo and in vitro. *J Anat* 86: 342-356, 1952

Dry F: The coat of the mouse (*mus musculus*). *J Gen* 187-340, 1926

Dudziak: Lehrbuch der Anästhesiologie. Stuttgart, New York, 1980

Ebling FJ: Hair. *J Invest Dermatol* 67: 98-105, 1976

Eby MT, Jasmin A, Kumar A, Sharma K, Chaudhary PM: TAJ, a novel member of the tumor necrosis factor receptor family, activates the c-Jun N-terminal kinase pathway and mediates caspase-independent cell death. *J Biol Chem* 275: 15336-15342, 2000

Ekert PG, Silke J, Vaux DL: Inhibition of apoptosis and clonogenic survival of cells expressing crmA variants: optimal caspase substrates are not necessarily optimal inhibitors. *Embo J* 18: 330-338, 1999

Fleischhauer K: Über die Entstehung der Haaranordnung und das Zustandekommen räumlicher Beziehungen zwischen Haaren und Schweissdrüsen. *Z Zellforsch u mikroskop Anat* 38: 328-355, 1953

Frisch SM, Vuori K, Kelaita D, Sicks S: A role for Jun-N-terminal kinase in anoikis; suppression by bcl-2 and crmA. *J Cell Biol* 135: 1377-1382, 1996

Gandarillas A: Epidermal differentiation, apoptosis, and senescence: common pathways? *Exp Gerontol* 35: 53-62, 2000

Gandarillas A, Goldsmith LA, Gschmeissner S, Leigh IM, Watt FM: Evidence that apoptosis and terminal differentiation of epidermal keratinocytes are distinct processes. *Exp Dermatol* 8: 71-79, 1999

Garcia-Martinez V, Macias D, Ganán Y, Garcia-Lobo JM, Francia MV, Fernandez-Teran MA, Hurle JM: Internucleosomal DNA fragmentation and programmed cell death (apoptosis) in the interdigital tissue of the embryonic chick leg bud. *J Cell Sci* 106: 201-208, 1993

Geng L and Potten CS: Changes after irradiation in the number of mitotic cells and apoptotic fragments in growing mouse hair follicles and in the width of their hairs. *Radiat Res* 123: 75-81, 1990

- Gerdes J, Li L, Schlueter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C, Stahmer I, Kloth S, Brandt E, Flad HD: Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol* 138: 867-873, 1991
- Gibbs H-F: A study of the post-natal development of the skin and hair of the mouse. *Anat rec* 80: 61-81, 1941
- Giovannini S: De la régénération de poils après l'épilation. *Arch mikr. Anat* 36: 528-564, 1890
- Glücksman A: Cell deaths in normal vertebrate ontogeny. *Biol-Rev* 26:59: 1951
- Goldberg MT, Tackaberry LE, Hardy MH, Noseworthy JH: Nuclear aberrations in hair follicle cells of patients receiving cyclophosphamide. A possible in vivo assay for human exposure to genotoxic agents. *Arch Toxicol* 64: 116-121, 1990
- Hammar SP and Mottet NK: Tetrazolium salt and electron-microscopic studies of cellular degeneration and necrosis in the interdigital areas of the developing chick limb. *J Cell Sci* 8: 229-251, 1971
- Hansen LS, Coggle JE, Wells J, Charles MW: The influence of the hair cycle on the thickness of mouse skin. *Anat Rec* 210: 569-573, 1984
- Harada T, Izaki S, Tsutsumi H, Kobayashi M, Kitamura K: Apoptosis of hair follicle cells in the second-degree burn wound under hypernatremic conditions. *Burns* 24: 464-469, 1998
- Hardin JA, Sherr DH, DeMaria M, Lopez PA: A simple fluorescence method for surface antigen phenotyping of lymphocytes undergoing DNA fragmentation. *J Immunol Methods* 154: 99-107, 1992
- Hardy M: The development of mouse hair in vitro with some observations of pigmentation. *J Anat.* 83: 364-386, 1949

Harmon B, Bell L, Williams L: An ultrastructural study on the "meconium corpuscles" in rat foetal intestinal epithelium with particular reference to apoptosis. *Anat Embryol* 169: 119-124, 1984

Hashimoto K: The ultrastructure of the skin of human embryos VI. Formation of the intradermal hair canal. *Dermatologica* 141: 49-54, 1970

Hedgecock EM, Sulston JE, Thomson JN: Mutations affecting programmed cell deaths in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science* 220: 1277-1279, 1983

Hengartner MO, Ellis RE, Horvitz HR: *Caenorhabditis elegans* gene *ced-9* protects cells from programmed cell death. *Nature* 356: 494-499, 1992

Hengartner MO and Horvitz HR: *C. elegans* cell survival gene *ced-9* encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene *bcl-2*. *Cell* 76: 665-676, 1994a

Hengartner MO and Horvitz HR: The ins and outs of programmed cell death during *C. elegans* development. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 345: 243-246, 1994b

Herr I, Wilhelm D, Meyer E, Jeremias I, Angel P, Debatin KM: JNK/SAPK activity contributes to TRAIL-induced apoptosis. *J Interferon Cytokine Res* 19: 261-269, 1999

Hollis DE and Chapman RE: Apoptosis in wool follicles during mouse epidermal growth factor (mEGF)-induced catagen regression. *J Invest Dermatol* 88: 455-458, 1987

Horvitz HR: Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer Res* 59: 1701s-1706s, 1999

Kerr JF, Harmon B, Searle J: An electron-microscope study of cell deletion in the anuran tadpole tail during spontaneous metamorphosis with special reference to apoptosis of striated muscle fibers. *J Cell Sci* 14: 571-585, 1974

- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-257, 1972
- Kimura K, Sasano H, Shimosegawa T, Kato K, Noguchi T, Mochizuki S, Sawai T, Koizumi M, Toyota T, Nagura H: Ultrastructural and confocal laser scanning microscopic examination of TUNEL-positive cells. *J Pathol* 181: 235-242, 1997
- Labat Moleur F, Guillermet C, Lorimier P, Robert C, Lantuejoul S, Brambilla E, Negoescu A: TUNEL apoptotic cell detection in tissue sections: critical evaluation and improvement critical evaluation and improvement. *J Histochem Cytochem* 46: 327-334, 1998
- Lazebnik YA, Kaufmann SH, Desnoyers S, Poirier GG, Earnshaw WC: Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* 371: 346-347, 1994
- Lenczowski JM, Dominguez L, Eder AM, King LB, Zacharchuk CM, Ashwell JD: Lack of a role for Jun kinase and AP-1 in Fas-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 17: 170-181, 1997
- Li L, Margolis LB, Paus R, Hoffman RM: Hair shaft elongation, follicle growth, and spontaneous regression in long-term, gelatin sponge-supported histoculture of human scalp skin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 8764-8768, 1992a
- Li L, Paus R, Margolis LB, Hoffman RM: Hair growth in vitro from histocultured skin [letter]. *In Vitro Cell Dev Biol* 0883-8364, 1992b
- Li L, Paus R, Slominski A, Hoffman RM: Skin histoculture assay for studying the hair cycle [letter]. *In Vitro Cell Dev Biol* 0883-8364, 1992c
- Lindner G, Botchkarev VA, Botchkareva NV, Ling G, van der Veen C, Paus R: Analysis of apoptosis during hair follicle regression (catagen). *Am J Pathol* 151: 1601-1617, 1997

Linnaeus C: *Systema naturae*. Leyden, 1758

Liu ZG, Hsu H, Goeddel DV, Karin M: Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *J Biol Chem* 271: 31929-31936, 1996

Lockshin RA and Williams CM: Programmed cell death. V. Cytolytic enzymes in relation to the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms. *J Insect Physiol* 11: 831-844, 1965

MacFarlane M, Cohen GM, Dickens M: JNK (c-Jun N-terminal kinase) and p38 activation in receptor-mediated and chemically-induced apoptosis of T-cells: differential requirements for caspase activation. *Science* 288: 870-874, 2000

Maruoka Y, Harada H, Mitsuyasu T, Seta Y, Kurokawa H, Kajiyama M, Toyoshima K: Keratinocytes become terminally differentiated in a process involving programmed cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 238: 886-890, 1997

McCarthy JV, Ni J, Dixit VM: RIP2 is a novel NF-kappaB-activating and cell death-inducing kinase. *J Biol Chem* 273: 16968-16975, 1998

Melino G, Candi E, Steinert PM: Assays for transglutaminases in cell death. *Methods Enzymol* 322: 433-472, 2000

Meyn RE, Stephens LC, Hunter NR, Milas L: Induction of apoptosis in murine tumors by cyclophosphamide. *Cancer Chemother Pharmacol* 33: 410-414, 1994

Milligan CE and Schwartz LM: Programmed cell death during animal development. *Br Med Bull* 53: 570-590, 1997

Mitra RS, Wrone-Smith T, Simonian P, Foreman KE, Nunez G, Nickoloff BJ: Apoptosis in keratinocytes is not dependent on induction of differentiation. *Lab Invest* 76: 99-107, 1997

- Miura M, Zhu H, Rotello R, Hartweg EA, Yuan J: Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 beta-converting enzyme, a mammalian homolog of the *C. elegans* cell death gene *ced-3*. *Cell* 75: 653-660, 1993
- Miyauchi S, Hashimoto K, Miki Y: The innermost cell layer of the outer root sheath is positive with Ki-67. *J Invest Dermatol* 95: 393-396, 1990
- Montagna W and van Scott EJ: The anatomy of the hair follicle. In: (eds.) W. Montagna and R. A. Ellis: *The biology of the hair growth.* , Academic Press, New York, 1958
- Mori C, Nakamura N, Kimura S, Irie H, Takigawa T, Shiota K: Programmed cell death in the interdigital tissue of the fetal mouse limb is apoptosis with DNA fragmentation. *Anat Rec* 242: 103-110, 1995
- Müller-Röver S and Paus R: Topobiology of the hair follicle. Austin, R.G. Landes Bioscience, 1998
- Negoescu A, Lorimier P, Labat Moleur F, Drouet C, Robert C, Guillermet C, Brambilla C, Brambilla E: In situ apoptotic cell labeling by the TUNEL method: improvement and evaluation on cell preparations. *J Histochem Cytochem* 44: 959-968, 1996
- Oberhammer F, Wilson JW, Dive C, Morris ID, Hickman JA, Wakeling AE, Walker PR, Sikorska M: Apoptotic death in epithelial cells: Cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. *EMBO J* 12: 3679-3684, 1993
- Paus R and Cotsarelis G: The biology of hair follicles. *N Engl J Med* 341: 491-497, 1999
- Paus R and Czarnetzki BM: New perspectives in hair research: in search of the "biological clock" of the hair cycle. *Hautarzt* 43: 264-271, 1992

Paus R, Eichmuller S, Hofmann U, Czarnetzki BM, Robinson P: Expression of classical and non-classical MHC class I antigens in murine hair follicles. *Br J Dermatol* 131: 177-183, 1994a

Paus R, Foitzik K, Welker P, Bulfone Paus S, Eichmuller S: Transforming growth factor-beta receptor type I and type II expression during murine hair follicle development and cycling. *J Invest Dermatol* 109: 518-526, 1997

Paus R, Handjiski B, Czarnetzki BM, Eichmüller S: A murine model for inducing and manipulating hair follicle regression (catagen): effects of dexamethasone and cyclosporin A. *J Invest Dermatol* 103: 143-147, 1994b

Paus R, Handjiski B, Eichmuller S, Czarnetzki BM: Chemotherapy-induced alopecia in mice. Induction by cyclophosphamide, inhibition by cyclosporine A, and modulation by dexamethasone. *Am J Pathol* 144: 719-734, 1994c

Paus R, Menrad A, Czarnetzki BM: Nekrobiologie der Haut: Apoptose. *Hautarzt* 46: 285-303, 1995

Paus R, Müller-Röver S, Botchkarev VA: Chronobiology of the hair follicle: hunting the "hair cycle clock". *J Invest Dermatol Symp Proc* 4: 338-345, 1999a

Paus R, Müller-Röver S, Van Der Veen C, Maurer M, Eichmüller S, Ling G, Hofmann U, Foitzik K, Mecklenburg L, Handjiski B: A comprehensive guide for the recognition and classification of distinct stages of hair follicle morphogenesis. *J Invest Dermatol* 113: 523-532, 1999b

Paus R, Rosenbach T, Haas N, Czarnetzki BM: Patterns of cell death: the significance of apoptosis for dermatology. *Exp Dermatol* 2: 3-11, 1993

Paus R, Stenn KS, Link RE: The induction of anagen hair growth in telogen mouse skin by cyclosporine A administration. *Lab Invest* 60: 365-369, 1989

Paus R, Stenn KS, Link RE: Telogen skin contains an inhibitor of hair growth. *Br J Dermatol* 122: 777-784, 1990

Paus R, van der Veen C, Eichmuller S, Kopp T, Hagen E, Muller Rover S, Hofmann U: Generation and cyclic remodeling of the hair follicle immune system in mice. *J Invest Dermatol* 111: 7-18, 1998

Perlman R, Schiemann WP, Brooks MW, Lodish HF, Weinberg RA: TGF-beta-induced apoptosis is mediated by the adapter protein Daxx that facilitates JNK activation. *Nat Cell Biol* 3: 708-714., 2001

Philpott M and Paus R: Principles of hair follicle morphogenesis. Austin, R.G. Landes Bioscience, 1998a

Philpott MP and Paus R: Principles of hair follicle morphogenesis. In: (eds.) C. M. Chuong: *Molecular Basis of Epithelial Appendage Morphogenesis.* , Landes Bioscience Publ., Austin, TX, 1998b

Philpott MP, Sanders D, Westgate GE, Kealey T: Human hair growth in vitro: a model for the study of hair follicle biology. *J Dermatol Sci* 7: S55-72, 1994

Pinkus H: Embryology of hair. In: (eds.) W. Montagna and R. A. Ellis: *The biology of the hair growth.* , Academic Press, New York, 1958

Polakowska RR, Piacentini M, Bartlett R, Goldsmith LA, Haake AR: Apoptosis in human skin development: morphogenesis, periderm, and stem cells. *Dev Dyn* 199: 176-188, 1994

Potten CS: Cell death (apoptosis) in hair follicles and consequent changes in the width of hairs after irradiation of growing follicles. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 48: 349-360, 1985

Potten CS, Wilson JW, Booth C: Regulation and significance of apoptosis in the stem cells of the gastrointestinal epithelium. *Stem Cells* 15: 82-93, 1997

- Raff MC: Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 356: 397-400, 1992
- Ray CA, Black RA, Kronheim SR, al. e: Viral inhibition of inflammation: cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1beta-converting enzyme. *Cell* 69: 597-604, 1992
- Riley PA: Epidermal melanin:sun screen or waste disposal? *Biologist* 44: 408-411, 1997
- Robins EJ: An ultrastructural study of the development of the hair, sebaceous gland, and other structures in human fetal skin. *Anatomy*. . London, St. Mary's Hospital Medical School of the University of London, 1974
- Robins EJ and Breathnach AS: Fine structure of the human foetal hair follicle at hair-peg and early bulbous-peg stages of development. *J Anat* 104: 553-569, 1969
- Roth SI: The cytology of the murine resting (telogen) hair follicle. *Biology of the skin and hair growth*. . Canberra, Angus and Robertson: 233-250, 1964
- Rothe M, Pan MG, Henzel WJ, Ayres TM, Goeddel DV: The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell* 83: 1243-1252, 1995
- Sailer BL, Nastasi AJ, Valdez JG, Steinkamp JA, Crissman HA: Differential effects of deuterium oxide on the fluorescence lifetimes and intensities of dyes with different modes of binding to DNA. *J Histochem Cytochem* 45: 165-175, 1997
- Saunders JW, Jr.: Death in embryonic systems. *Science* 154: 604-612, 1966
- Sawhney N and Hall PA: Ki67-structure, function, and new antibodies. *J Pathol* 168: 161-162, 1992

- Schilli MB, Paus R, Menrad A: Reduction of intrafollicular apoptosis in chemotherapy-induced alopecia by topical calcitriol-analogs. *J Invest Dermatol* 111: 598-604, 1998
- Schwartz LM and Milligan CE: Cold thoughts of death: the role of ICE proteases in neuronal cell death. *Trends Neurosci* 19: 555-562, 1996
- Schwarz A, Bhardwaj R, Aragane Y, Mahnke K, Riemann H, Metze D, Luger TA, Schwarz T: Ultraviolet-B-induced apoptosis of keratinocytes: evidence for partial involvement of tumor necrosis factor-alpha in the formation of sunburn cells. *J Invest Dermatol* 104: 922-927, 1995
- Shaham S and Horvitz HR: Developing *Caenorhabditis elegans* neurons may contain both cell-death protective and killer activities. *Genes Dev* 10: 578-591, 1996
- Shimizu S, Eguchi Y, Kamiike W, Matsuda H, Tsujimoto Y: Bcl-2 expression prevents activation of the ICE protease cascade. *Oncogene* 12: 2251-2257, 1996
- Silver AF and Chase HB: DNA synthesis in the adult hair germ during dormancy (telogen) and activation (early anagen). *Dev Biol* 21: 440-451, 1970
- Soma T, Ogo M, Suzuki J, Takahashi T, Hibino T: Analysis of apoptotic cell death in human hair follicles in vivo and in vitro. *J Invest Dermatol* 111: 948-954, 1998
- Song Q, Lees-Miller SP, Kumar S, Zhang Z, Chan DW, Smith GC, Jackson SP, Alnemri ES, Litwack G, Khanna KK, Lavin MF: DNA-dependent protein kinase catalytic subunit: a target for an ICE-like protease in apoptosis. *Embo J* 15: 3238-3246, 1996
- Sulston JE and Horvitz HR: Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 56: 110-156, 1977
- Sulston JE, Schierenberg E, White JG, Thomson JN: The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 100: 64-119, 1983

Sundberg J: Handbook of mouse mutations with skin and hair abnormalities. Boca Roton, CRC Press, 1994

Tamada Y, Takama H, Kitamura T, Yokochi K, Nitta Y, Ikeya T, Matsumoto Y: Identification of programmed cell death in normal human skin tissues by using specific labelling of fragmented DNA. *Br J Dermatol* 131: 521-524, 1994

Tatsuta T, Shiraishi A, Mountz JD: The prodomain of caspase-1 enhances Fas-mediated apoptosis through facilitation of caspase-8 activation. *J Biol Chem* 275: 14248-14254, 2000

Tewari M, Quan LT, K OR, Desnoyers S, Zeng Z, Beidler DR, Poirier GG, Salvesen GS, Dixit VM: Yama/CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell* 81: 801-809, 1995

Tezuka M, Ito M, Ito K, Sato Y: Cell kinetic study of human and mouse hair tissues using anti-bromodeoxyuridine monoclonal antibody. *J Dermatol Sci* 1: 335-346, 1990

Thome M, Hofmann K, Burns K, Martinon F, Bodmer JL, Mattmann C, Tschopp J: Identification of CARDIAK, a RIP-like kinase that associates with caspase-1. *Curr Biol* 8: 885-888, 1998

Thornberry NA and Molineaux SM: Interleukin-1 beta converting enzyme: a novel cysteine protease required for IL-1 beta production and implicated in programmed cell death. *Protein Sci* 4: 3-12, 1995

Tobin DJ, Fenton DA, Kendall MD: Cell degeneration in alopecia areata. An ultrastructural study. *Am J Dermatopathol* 13: 248-256, 1991

Tomei LD and Cope FO: Apoptosis: The molecular basis of cell death, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1991

Trotter M: The life cycles of hair in selected regions of the body. *Am J Phys Anthropol* 7: 427-437, 1924

Uren AG, Pakusch M, Hawkins CJ, Puls KL, Vaux DL: Cloning and expression of apoptosis inhibitory protein homologs that function to inhibit apoptosis and/or bind tumor necrosis factor receptor-associated factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 4974-4978, 1996

Vaux DL: Toward an understanding of the molecular mechanisms of physiological cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 786-789, 1993

Vaux DL, Haeccker G, Strasser A: An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell* 76: 777-779, 1994

Vaux DL and Strasser A: The molecular biology of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 2239-2244, 1996

Villunger A, Huang DC, Holler N, Tschopp J, Strasser A: Fas ligand-induced c-Jun kinase activation in lymphoid cells requires extensive receptor aggregation but is independent of DAXX, and fas-mediated cell death does not involve DAXX, RIP, or RAIDD. *Cancer Res* 60: 3947-3956, 2000

Virdee K, Bannister AJ, Hunt SP, Tolkovsky AM: Comparison between the timing of JNK activation, c-Jun phosphorylation, and onset of death commitment in sympathetic neurones. *Oncogene* 15: 837-843, 1997

Walker NP, Talanian RV, Brady KD, Dang LC, Bump NJ, Ferez CR, Franklin S, Ghayur T, Hackett MC, Hammill LD, et al.: Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)<sub>2</sub> homodimer. *Cell* 78: 343-352, 1994

Wang CY, Mayo MW, Baldwin AS: TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: Potentiation by inhibition of NF-kappa B. *Science* 274: 784-787, 1996

- Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS, Jr.: NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 281: 1680-1683, 1998
- Ware CF, VanArsdale S, VanArsdale TL: Apoptosis mediated by the TNF-related cytokine and receptor families. *J Cell Biochem* 60: 47-55, 1996
- Weedon D and Strutton G: Apoptosis as the mechanism of the involution of hair follicles in catagen transformation. *Acta Derm Venereol* 61: 335-339, 1981
- Weinstein GD and Mooney KM: Cell proliferation kinetics in the human hair root. *J Invest Dermatol* 74: 43-46, 1980
- Weiss LM, Strickler JG, Medeiros LJ, Gerdes J, Stein H, Warnke RA: Proliferative rates of non-Hodgkin's lymphomas as assessed by Ki-67 antibody. *Hum Pathol* 18: 1155-1159, 1987
- Whiteside G, Cougnon N, Hunt SP, Munglani R: An improved method for detection of apoptosis in tissue sections and cell culture, using the TUNEL technique combined with Hoechst stain. *Brain Res Brain Res Protoc* 2: 160-164, 1998
- Wu S, Loke HN, Rehemtulla A: Ultraviolet radiation-induced apoptosis is mediated by Daxx. *Neoplasia* 4: 486-492., 2002
- Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR: Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68: 251-306, 1980
- Yang X, Khosravi-Far R, Chang HY, Baltimore D: Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis. *J Neurochem* 69: 550-561, 1997
- Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR: The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* 75: 641-652, 1993

Yuan JY and Horvitz HR: The *Caenorhabditis elegans* genes *ced-3* and *ced-4* act cell autonomously to cause programmed cell death. *Dev Biol* 138: 33-41, 1990

Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X: Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome C-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90: 405-413, 1997

## 8 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt den vielen Menschen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Für ihre Zusammenarbeit danke ich ganz besonders:

Herrn Prof. Dr. K. für die Überlassung des Themas, die dabei gewährte Freiheit während der Bearbeitung und für die wertvollen Anregungen und Diskussionen.

Herrn Dr. M. für die zahlreichen Ratschläge und Tips, die Korrekturen und seine unermüdliche Diskussionsfreude, die einen großen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geliefert haben.

Dr. T., in dessen Labor ich eineinhalb Jahre verbringen durfte, für seine große Geduld und Hilfsbereitschaft in allen Bereichen.

Prof. Dr. P., den keine noch so seltsame Frage aus dem Gleichgewicht bringen konnte, für seine Ideen und Inspirationen und auch für sein Drängen.

Der Arbeitsgruppe Mastzelle, insbesondere A., D., S., A., V., HJ., F., W. und K. Vor allem aber M., für seine freundschaftliche Hilfe, sein geduldiges Zuhören und sein kenntnisreiches Erklären und E. für ihre Motivation.

Den Arbeitsgruppen um Dr. T. und Prof. S., namentlich U. selbst und ihrem Mann Prof. W., S., J., M., und M.

Der Arbeitsgruppe um Prof. P., vor allem R. und E. Zu großem Dank bin ich G., S. und E. verpflichtet, die mir als Tutoren und Freunde halfen.

Der größte Dank aber gilt meinen Eltern.

## 9 Lebenslauf

### Zur Person:

Name: Markus Alexander Karl Magerl  
Anschrift: Am Taubertsberg 2  
55122 Mainz  
geboren am: 09.05.1969 in Heidenheim an der Brenz

### Schulbildung:

Grundschule Königsbronn,  
C.E.P Claretiano/Andino, Huancayo/Perú,  
Realschule Königsbronn,  
Technisches Gymnasium Heidenheim abgeschlossen mit Abitur 1975-1989

### Dienst:

Zivildienst als Pflegehelfer in der Inneren Abteilung  
im Kreiskrankenhaus Buchen im Odenwald 1989-1990  
Zivildienst in der individuellen Schwerstbehindertenbetreuung  
des Arbeiter-Samariter-Bundes in Neckargemünd 1990

### Studium:

Humanmedizin Freie Universität Berlin ab 4/1991  
Humanmedizin Humboldt-Universität zu Berlin ab 10/1995

### Famulaturen:

Innere Abteilung des Kreiskrankenhauses Heidenheim 2-3 und 9-10/1995  
Dermatologische Abteilung der Charité-Berlin 8/1997, 2-3/1998  
Neurologie, Leer 8-9/1998

Examina:

Physikum	3/1994
Erstes Staatsexamen	3/1998
Zweites Staatsexamen	3/1999
Drittes Staatsexamen	5/2000

Praktisches Jahr:

Tertiale des Praktischen Jahres im

Krankenhaus Prenzlauer Berg in Berlin Unfallchirurgie, Plastische Chirurgie	4-8/1999
Krankenhaus Prenzlauer Berg in Berlin Innere Medizin, Schwerpunkt Infektiologie, HIV, Hepatitiden	8-12/1999
Universitätsklinikum Zürich Dermatologie Dermatochirurgie, Haarsprechstunde	12/1999- 3/2000

Forschungsaufenthalt:

Aufenthalt als Research Fellow am Department of Biomedical Sciences der Universität Bradford/UK. Wichtige Teile der experimentellen Arbeiten für die vorliegende Schrift wurden in Bradford durchgeführt.	7/2000 – 9/2001
---	-----------------

AIP:

in der Hautklinik der Universität Mainz, Stationsarbeit, Urtikariasprechstunde und AG Mastzelle/Labor	seit 10/2001
--	--------------